



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Βιοπληροφορική ανάλυση έκφρασης μικρών μη κωδικών μορίων
RNA στον ορό ασθενών με οστεοαρθρίτιδα»**

**ΣΑΜΑΡΑΣ ΣΤΑΥΡΟΣ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, Επ. Καθηγ. Κυτταρικής Βιολογίας, Π.Θ(επιβλέπουσα)

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, Καθ. Ιατρικής Γενετικής, Π.Θ

ΤΖΕΤΗ ΜΑΡΙΑ, Αναπλ. Καθηγ. Γενετικής ΕΚΠΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

**Bioinformatics analysis of miRNA expression in the serum
of osteoarthritis patients**

SAMARAS STAVROS
Molecular Biologist

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
Abstract.....	6
Εισαγωγή.....	7
1. Οστεοαρθρίτιδα.....	7
1.1 Παθογένεση.....	7
1.2 Γενετική συμμετοχή στην οστεοαρθρίτιδα.....	8
1.3 Επιγενετική συμμετοχή στην ΟΑ.....	9
1.4 Η ηλικία.....	9
1.5 Παχυσαρκία.....	10
2.1 MicroRNA, βιογένεση, λειτουργία και δράση.....	11
2.2 Βιολογικά στοιχεία στην υπολογιστική ανάλυση.....	15
2.2.1 Αλληλουχία του miRNA.....	16
2.2.2 3' UTR περιοχή του mRNA.....	17
2.2.3 Η αλληλουχία έναρξης.....	17
2.2.4 Ελεύθερη ενέργεια και παρεχόμενη ενέργεια.....	18
2.2.5 3' περιοχή του miRNA.....	18
2.2.6 Συντηρημένες εξελικτικά περιοχές.....	18
2.2.7 Άλλες περιοχές στόχοι.....	19
2.2.8 Τα πλαίσια.....	19
2.3 Διαφορετικές προσεγγίσεις της βιοπληροφορικής στη μελέτη των miRNAs.....	20
2.4 Αναγνώριση των miRNAs.....	21
2.5 Εργαλεία για την πρόβλεψη γονιδίων-στόχων των miRNAs.....	24
2.6 Εύρεση των γονιδίων στόχων των miRNA που έχουν επαληθευτεί πειραματικά.....	27
2.7 Συσχέτιση των miRNAs και της έκφρασης των mRNAs.....	28
2.8 Ανάλυση των σηματοδοτικών και μεταβολικών μονοπατιών των miRNAs.....	30
2.9 Αλληλεπίδραση miRNA και μεταγραφικών παραγόντων.....	31
3. Σύνδεση miRNAs και ασθενειών.....	33
3.1 Η απορρύθμιση του miRNA στις ανθρώπινες ασθένειες.....	33
3.2 Εξωκντάρια κυκλοφορούντα miRNAs.....	34
3.3 MiRNAs, περιβαλλοντικοί παράγοντες και φαινότυπος.....	35
3.4 Οι πολυμορφισμοί των miRNA στόχων που συσχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες.....	36
3.5 Μεταλλάξεις στα miRNAs και στις θέσεις-στόχους τους.....	38
4. Σκοπός.....	38
5. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
5.1 Βιοπληροφορική ανάλυση.....	39
5.2 Αποτελέσματα.....	40
5.2.1 Επιλογή των miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p.....	40
5.2.2 Εύρεση των προβλεπόμενων γονιδίων-στόχων των miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p.....	40
5.2.3 Ανάλυση των μοριακών, κυτταρικών και βιολογικών λειτουργιών των προβλεπόμενων γονιδίων στόχων των miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p.....	41

A) Μοριακές λειτουργίες	41
B) Κυτταρικές λειτουργίες.....	43
Γ) Βιολογικές διεργασίες	45
Δ) Ταξινόμηση πρωτεϊνών.....	46
5.2.4 Ανάλυση μονοπατιών κατά KEGG με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής DAVID	48
6. Συζήτηση.....	53
7. Βιβλιογραφία:	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) είναι πολυπαραγοντική εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων, στην οποία έχουμε σταδιακή αλλοίωση όλων των δομών της άρθρωσης η οποία οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας των αρθρώσεων. Τα miRNAs είναι μικρά μη κωδικά μόρια RNA τα οποία αποσιωπούν την έκφραση γονιδίων στοχεύοντας κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA στόχου τους. Τα miRNAs εμπλέκονται στον έλεγχο διαφόρων κυτταρικών διαδικασιών και συμμετέχουν στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών μεταξύ των οποίων και η οστεοαρθρίτιδα. Η παρούσα διπλωματική εργασία βασίστηκε σε αποτελέσματα μεγάλης κλίμακας ανάλυσης με τη χρήση μικροσυστοιιών της έκφρασης microRNAs σε ορό ασθενών με ΟΑ και σε υγιή άτομα. Αναδείχθηκαν τα miR-33b-3p, miR-4284, miR-6737-3p, miR-6858-3p, miR-7110-5p τα οποία εμφάνισαν διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό μεταξύ ασθενών με ΟΑ και φυσιογικών ατόμων. Μέσω των βιοπληροφορικών εργαλείων Targetscan, DAVID-KEGG, Panther αναζητήθηκαν τα γονίδια στόχοι των 5 miRNAs και διαπιστώθηκε ότι συμμετέχουν σε κοινές μοριακές, κυτταρικές και βιολογικές λειτουργίες. Επίσης διαπιστώθηκε ότι συμμετέχουν σε κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως του μεταβολισμού γλυκερολιπιδίων, γλυκεροφωσφολιπιδίων και γλυκοσφιγγολιπιδίων, βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, αντιποκινών και ινσουλίνης. Τα ανωτέρω σηματοδοτικά μονοπάτια εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΟΑ, το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα της ανάγκης περαιτέρω μελέτης για την ανάδειξη του μηχανισμού δράσης αυτών.

Abstract

OA is a multifactorial degenerative joint disease in which we have a gradual deterioration of all joint structures leading to loss of joint function. MiRNAs are small non-coding RNA molecules that silence gene expression by targeting mainly the 3' untranslated region of their target mRNAs. MiRNAs are involved in the control of various cellular processes and are involved in the development of various diseases, including choroarthritis. The present Master thesis was based on large-scale analysis study that was performed in the Laboratory of Cytogenetics and Molecular Geneticss at University of Thessaly, using high resolution microarrays to evaluate the expression profile of microRNAs in the serum of patients with OA and in healthy subjects. MiR-33b-3p, miR-4284, miR-6737-3p, mirR-6858-3p, miR-7110-5p were shown to exhibit differentiated serum expression levels between OA patients A and healthy individuals. The target genes of the above metntioned 5 miRNAs were identified through the Targetscan, DAVID-KEGG and Panther bioinformatics tools and were found to be involved in common molecular, cellular and biological functions. Common signaling pathways such as glycerophospholipid, glycerophospholipid and glycosphagolipid metabolism, biosynthesis fatty acids, anti-inflammables and insulin were also identified between the 5 miRNAs. The above signaling pathways are involved in the development of OA, suggesting that there is need for further functional studies to clarify the role and mechanism of action of the above miRs in OA development.

Εισαγωγή

1. Οστεοαρθρίτιδα

Η οστεοαρθρίτιδα είναι η πιο κοινή μορφή αρθρίτιδας και η κύρια αιτία μειωμένης κινητικότητας στους ηλικιωμένους (Felson et al. 2006). Έχει προβλεφθεί ότι περισσότεροι από 67 εκατομμύρια άνθρωποι θα επηρεαστούν από την ΟΑ στις ΗΠΑ μέχρι το 2030, με αποτέλεσμα εξαιρετικά υψηλή κοινωνικοοικονομική επιβάρυνση (Hunter et al. 2014, Hootman et al. 2006).

Τα τελευταία χρόνια, η χειρουργικά προκαλούμενη αποσταθεροποίηση του μέσου μηνίσκου (medial meniscus -DMM) (Glasson et al. 2007) και γενετικά μοντέλα ποντικών (Shen et al. 2013, Serra et al. 1997, Yang et al. 2001, Little et al. 2009, Lin et al. 2009, Mirando et al. 2013, Glasson et al. 2005, Stanton et al. 2005), έχουν βοηθήσει στη περιγραφή του πιθανού ρόλου των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση της ΟΑ. Ωστόσο, η πλήρης κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν την έναρξη και την εξέλιξη της ΟΑ δεν είναι ακόμα δυνατή, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει πρόωμη κλινική διάγνωση της πάθησης στα αρχικά στάδια, και ικανότητα ίασης στο τελικό στάδιο της ΟΑ. Η χορήγηση παυσίπονων ή/και χειρουργική ανάπλαση της άρθρωσης παραμένουν οι μόνες θεραπευτικές παρεμβάσεις (Anderson et al. 2011, van den Berg et al. 2010, Bijlsma et al. 2011).

Η οστεοαρθρίτιδα είναι μία πολυπαραγοντική πάθηση με γενετικό και επιγενετικό υπόβαθρο (Fernandez-Tajes et al. 2014, Rushton et al. 2014, Delgado-Calle et al. 2013), με επίδραση από παράγοντες όπως η ηλικία, η παχυσαρκία, η εμβιομηχανική φόρτιση των αρθρώσεων, μεταβολικοί παράγοντες να συμμετέχουν στην αιτιοπαθογένειά της (Krasnokutsky et al. 2007, Wang et al. 2011).

1.1 Παθογένεση

Η ΟΑ είναι μία εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων με κλινικά συμπτώματα, συμπεριλαμβανομένου του χρόνιου πόνου, τη δυσλειτουργία των αρθρώσεων, τη δυσκαμψία και τη μείωση του εσωτερικού χώρου της άρθρωσης. Κατά την εξέλιξη της ΟΑ, τα αρθρικά χονδροκύτταρα υπερτροφούν, οδηγώντας σε αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας (extracellular matrix – ECM), εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, ακολουθούμενη από αγγειογένεση, σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού, ανάπτυξη

οστεοφύτων και φλεγμονή του αρθρικού υμένα (Sandell et al. 2012, Dos et al. 2008, Goldring et al. 2007).

Ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου ως πρώιμο στάδιο της νόσου θεωρείται ένας σημαντικός παράγοντας που οδηγεί στην καταστροφή της άρθρωσης. Φυσιολογικά ο αρθρικός χόνδρος αναπτύσσεται, κατά τη διάρκεια της μεταγεννητικής περιόδου, ως μόνιμος ιστός, διαχωρισμένος από τη πλάκα ανάπτυξης. Η επιφάνεια του αρθρικού χονδρικού ιστού εμφανίζεται να είναι στη διαρθρωτική περιοχή, λεία, σκληρή, λευκή με ικανότητα να λειτουργεί ως απορροφητής των δυνάμεων που αναπτύσσονται στη περιοχή της άρθρωσης. Το κολλαγόνο και οι πρωτεογλυκάνες είναι τα κύρια συστατικά μόρια της εξωκυττάριας ουσίας (ECM) του αρθρικού χόνδρου (Eyre et al. 2002, Knudson et al. 2000, Verzijl et al. 2000, Kannu et al. 2009). Πολυμορφισμοί γονιδίων των ECM-συστατικών, συμπεριλαμβανομένων του τύπου II, IX και XI κολλαγόνου έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με OA (Rodriguez et al. 2003, Jeong et al. 2014, Carlson et al. 2006). Είναι πλέον διαπιστωμένο ότι η δυσλειτουργία των χονδροκυττάρων είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη διαδικασία του εκφυλισμού της άρθρωσης στην OA.

1.2 Γενετική συμμετοχή στην οστεοαρθρίτιδα

Η γενετική προδιάθεση της OA έχει διαπιστωθεί εδώ και πολλά χρόνια, μέσω μελετών δίδυμων, αναλύσεων συσχέτισης για ανάδειξη υποψήφιων γονιδίων (Spector et al. 1996, Felson et al. 1998, Loughlin et al. 2000). Παρόλο που η γενετική της OA είναι πολύπλοκη, η γενετική συμμετοχή είναι αρκετά σημαντική. Έχει αποδειχθεί ότι η κληρονομική συνεισφορά στην OA κυμαίνεται από 40-65%, ανάλογα με τον τόπο και τον πληθυσμό (Zhang et al. 2010). Την περασμένη δεκαετία, ο δυνητικός ρόλος των γονιδίων και των σηματοδοτικών μονοπατιών στην OA απεδείχθει μέσω μελετών σε ιστούς ασθενών με OA και in vivo σε πειραματόζωα, μέσω χειρουργικά επαγόμενης ανάπτυξης OA, όπως και γενετικά τροποποιημένων ποντικών.

Σηματοδοτικά μονοπάτια των TGF- β , Wnt/ β -κατενίνης, Indian Hedgehog (Ihh), Notch, FGF (fibroblast growth factor) και του HIF (hypoxia-inducible factor), έχει δειχθεί ότι επάγουν την υπερτροφία των χονδροκυττάρων. Ο ρόλος τους έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά ζωικά μοντέλα της νόσου (Shen et al. 2013, Serra et al. 1997, Yang et al. 2001, Lin et al. 2009, Mirando et al. 2013, Wang et al. 2012). Μελέτες έχουν

δείξει ότι ο παράγοντας RUNX2 η μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-13 και ο ADAMTS5 είναι κοινά γονίδια στόχοι των ανωτέρω σηματοδοτικών μονοπατιών, διαταράσσοντας τη αναβολική-καταβολική ισορροπία στα χονδροκύτταρα, οδηγώντας στον εκφυλισμό του χόνδρου μέσω ενίσχυσης των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP), της δισιντεγκρίνης και των μεταλλοπρωτεϊνών με δράση θρομβοσπνδίνης (ADAMTS), το οποίο οδηγεί σε αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου II και της αγγρεκάνης (Little et al. 2009, Glasson et al. 2005, Hirata et al. 2012, Barnholtz-Sloan et al. 2005, Kim et al. 2014). Μεγάλες μελέτες GWAS ανέδειξαν γονίδια που προδιαθέτουν στη ανάπτυξη OA. Ειδικότερα ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια σημαντικών δομικών και ECM-σχετικών παραγόντων (Col2a1, Col9a1, Col11a1), καθώς και των σηματοδοτικών μονοπατιών Wnt (Sfrp3), BMP (bone morphogenetic protein) (Gdf5), TGF- β (Smad3). Στα περισσότερα είχε υπάρξει επιβεβαίωση συμμετοχής στην OA, μέσω πειραματικών μοντέλων της νόσου (Rodriguez et al. 2003, Jeong et al. 2014, Carlson et al. 2006, Loughlin et al. 2004, Bijsterbosch et al. 2013, Valdes et al. 2010, Zhang et al. 2015). Τέλος SNPs ταυτοποιήθηκαν σε αρκετά γονίδια όπως το GNL2, ASTN2, CHST11 μέσω genome-wide screen μελέτες (arcOGEN Consortium et al. 2012), ωστόσο τα δεδομένα χρειάζονται περεταίρω επιβεβαίωση.

1.3 Επιγενετική συμμετοχή στην OA

Πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν το ρόλο της επιγενετικής ρύθμισης ως ένα σημαντικό παράγοντα στην ποθολογία και στην εξέλιξη της OA.

Επιγενετικές αναλύσεις έδωσαν νέα οπτική στο ρόλο της μεθυλίωσης, στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων, κυτοκινών, ECM πρωτεϊνών και MMPs στην OA (Zhang et al. 2014).

1.4 Η ηλικία

Ένας από τους πιο κοινούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη OA είναι η ηλικία. Η πλειοψηφία των ανθρώπων άνω των 65 ετών διαγιγνώσκονται με αλλαγές σε μία ή περισσότερες αρθρώσεις, με τη χρήση ακτινογραφίας (Felson et al. 1987, Jordan et al. 2007, Dillon et al. 2006, van Saase et al. 1989, Andrianakos et al. 2006). Μελέτες σε αρθρικά χονδροκύτταρα δείχνουν ότι τα μεγαλύτερης ηλικίας κύτταρα εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες, το οποίο προάγει τη κυτταρική γήρανση, και

μεταβάλλει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων(Loeser et al. 2011, Kim et al. 2010, Goodwin et al. 2010, Naik et al. 2011). Σε μία σπάνια μορφή της OA, στην ασθένεια Kashin-Back, η εξέλιξη της ασθένειας σχετίστηκε με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κυτταρικό θάνατο(Liu et al. 2010).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της γήρανσης των χονδροκυττάρων είναι η μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης. Ειδικότερα, σε χονδροκύτταρα από ηλικιωμένους με OA, παρατηρείται να αυξάνεται η αναλογία των TGF- β υποδοχέων ALK1 σε ALK5, το οποίο οδηγεί σε καταστολή του μονοπατιού TGF- β και στον καταβολισμό μέσω έκφρασης μετταλοπρωτεϊνών (MMP- matrix metalloproteinase)(Blaney Davidson et al. 2009, van der Krann et al. 2010). Πρόσφατες μελέτες σε γερασμένα κύτταρα δείχνουν, ότι ολόκληρο το γενωμικό DNA εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης (Richardson et al. 2003, Christensen et al. 2009). Η αλληλούχιση του γονιδιώματος ασθενών με OA επιβεβαίωσε ότι αυτές οι επιγενετικές αλλοιώσεις παρουσιάζεται στα χονδροκύτταρα με OA (Fernandez-Tajes et al. 2014, Jeffries et al. 2014, den Hollander et al. 2014), εν μέρει λόγω αλλαγών στην έκφραση των ενζύμων Dnmts (μεθυλίωση) και Tets (από-μεθυλίωση) (Haseeb et al. 2014, Taylor et al. 2014, Taylor et al. 2015).

1.5 Παχυσαρκία

Τα τελευταία χρόνια η παχυσαρκία αποτελεί παγκόσμια επιδημία. Η σχέση μεταξύ παχυσαρκίας και OA έχει αναγνωριστεί από καιρό (Felson et al. 1988, Anandacoomarasamy et al. 2008). Ασθενείς με παχυσαρκία, αναπτύσσουν OA νωρίτερα, έχουν πιο σοβαρά συμπτώματα, υψηλότερο κίνδυνο για λοίμωξη και περισσότερες τεχνικές δυσκολίες στη χειρουργική ανάπλαση της άρθρωσης.

Εκτός από τη φόρτιση δυνάμεων στην άρθρωση του γόνατος, η παχυσαρκία συμβάλλει στην συστηματική φλεγμονή χαμηλού επιπέδου, μέσω της έκκρισης κυτταροκινών από τον λιπώδη ιστό, των αντιποκινών (Conde et al. 2011, Das UN et al. 2001, Fain et al. 2010), Ειδικότερα, τα επίπεδα των πρό-φλεγμονωδών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων της IL-1 β , IL-6, IL-8, του TNF- α εμφανίζονται αυξημένα (Bunout et al. 1996, Visser et al. 2001, Aygun et al. 2005, Pou et al. 2007, Straczkowski et al. 2002), και σε παχυσαρκούς ποντικούς σε δίαιτα υψηλής κατανάλωσης λιπαρών(Zhou et al. 2011, Neels et al. 2009, Brown et al. 2014, Louer et al. 2012) και σε ασθενείς με παχυσαρκία (Stehouwer et al. 2002, Duncan et al. 2003,

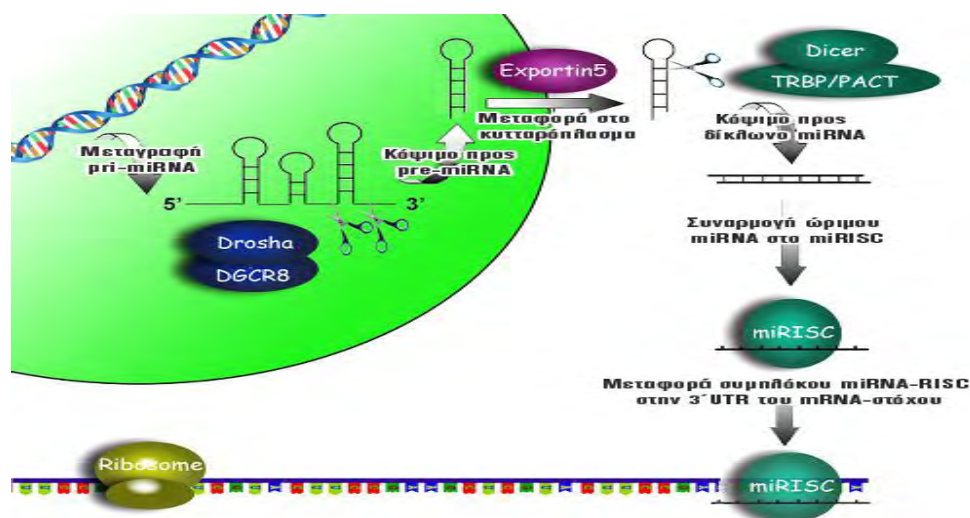
Wellen et al. 2005). Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να ενεργοποιήσουν το NF-κΒ σηματοδοτικό μονοπάτι, και καταβολικές διεργασίες στα χονδροκύτταρα οι οποίες οδηγούν στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας (ECM), μέσω ενίσχυσης των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP) (Kapoor et al. 2011, Fernandes et al. 2002, Martel-Pelletier et al. 1999).

2.1 MicroRNA, βιογένεση, λειτουργία και δράση.

Τα τελευταία χρόνια η πρόοδος στον τομέα των Βιοεπιστημών οδήγησε στην ανακάλυψη των μικρών μορίων RNAs τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, γνωστά ως microRNAs (miRNAs ή miRs). Πρόκειται για μικρά μη-κωδικά μόρια RNA μήκους 18-25 νουκλεοτιδίων τα οποία αποτελούν σημαντικούς μετα-μεταγραφικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης.

Η βιογένεση των miRNAs είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που ξεκινά στο πυρήνα του κυττάρου και ολοκληρώνεται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1). Η διαδικασία της βιογένεσης ξεκινάει με τη μεταγραφή του microRNA του γονιδίου από την RNA-πολυμεράση II παράγοντας το πρωταρχικό μόριο, το pri-miRNA. Το pri-miRNA αναδιπλώνεται σε δομή φουρκέτας, με μονόκλωνα 5' και 3' άκρα. Ακολούθως το pri-miRNA ενδονουκλεοτιδική πέψη από το ένζυμο Drosha, το οποίο ανήκει στην κατηγορία της RNA-πολυμεράση III. (Lee, Yet et al. 2004, Borchert et al. 2006). Αποτέλεσμα της παραπάνω διεργασίας είναι η παραγωγή των πρόδρομων μορίων miRNA, τα pre-miRNA. Η παραγωγή του pre-miRNA καταλύεται από ένα πυρηνικό σύμπλοκο, το οποίο σχηματίζεται από το ένζυμο Drosha και το συμπαράγοντα Pasha (Di George Syndrome Critical Region 8) (Bartel et al. 2004). Το πρόδρομο-mRNA εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω του συμπλόκου της εξπορτίνης-5 (Exportin-5) και της Ran-GTP πρωτεΐνης (Zeng, Yet et al. 2004, Bohnsack et al. 2004). Στο κυτταρόπλασμα, υποβάλλεται σε περαιτέρω επεξεργασία υπό τη δράση του ένζυμου Dicer (RNase III) σε συνδυασμό με της πρωτεΐνης TAR (Rna binding protein - TRBP) με αποτέλεσμα να αποκόπτεται το άκρο της φουρκέτας του pre-miRNA και να παράγεται το δίκλωνο μόριο miRNA:miRNA (Hutwagner et al. 2001). Το δίκλωνο μόριο αποδιατάσσεται και το ώριμο miRNA συνδέεται με τον πρωτεΐνη Argonaute (Ago2), σχηματίζοντας το σύμπλοκο RISC (Rna-induced silencing complex) (Bartel et al. 2004, Winter et al. 2009). Μόλις σχηματισθεί το miRISC, το miRNA μπορεί να επάγει τη δράση αποσιώπησης του mRNA-στόχου, είτε μέσω

αποικοδόμησης, είτε με καταστολή της μεταγραφής ή επάγοντας την απαδενυλίωση του mRNA-στόχου (Winter et al. 2009).



Εικόνα 1. Βιογένεση των microRNAs

Ο λειτουργικός ρόλος των miRNAs έγκειται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης όπου κατά κύριο λόγο αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές αυτής. (Ambros et al, 2001). Στους ανθρώπους, τα miRNAs προσδένονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) του mRNA-στόχου είτε με μερική είτε με πλήρη συμπληρωματικότητα καταστέλλοντας τη μεταγραφή του mRNA-στόχου (Ambros et al. 2004). Στα ζώα, ο κύριος μηχανισμός αποσιώπησης των miRNAs συνίσταται στην αποσταθεροποίηση του mRNA-στόχου επιδρώντας με αυτό το τρόπο στα επίπεδα της μετάφρασης (Lim et al. 2005, Pillai et al. 2005). Μικρός αριθμός miRNAs εμφανίζουν αποικοδομητική δράση, με την άμεση προσδέση σε διάφορες πρωτεΐνες, όπως πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA, αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση τους με τους RNA στόχους (Eiring et al. 2010). Τέλος, σε μερικές περιπτώσεις τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε μεταγραφικό επίπεδο με άμεση πρόσδεση σε DNA ρυθμιστικά στοιχεία (Kim et al. 2008), ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους αποτελούν θετικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης ενισχύοντας τη διαδικασία της μετάφρασης (Vasudevan et al. 2007).

Σημαντικό αριθμός ερευνών αναφέρει ότι διαταραχές της έκφρασης ή και λειτουργίας των microRNAs έχουν συσχετιστεί με πληθώρα παθήσεων (Gong et al. 2005, Santamariaetal et al. 2014, Condorelli et al. 2014, Guayetal et al. 2011, Garzonetal et al. 2010). Τα περισσότερα δεδομένα σχετικά με το ρόλο των miRNAs σε

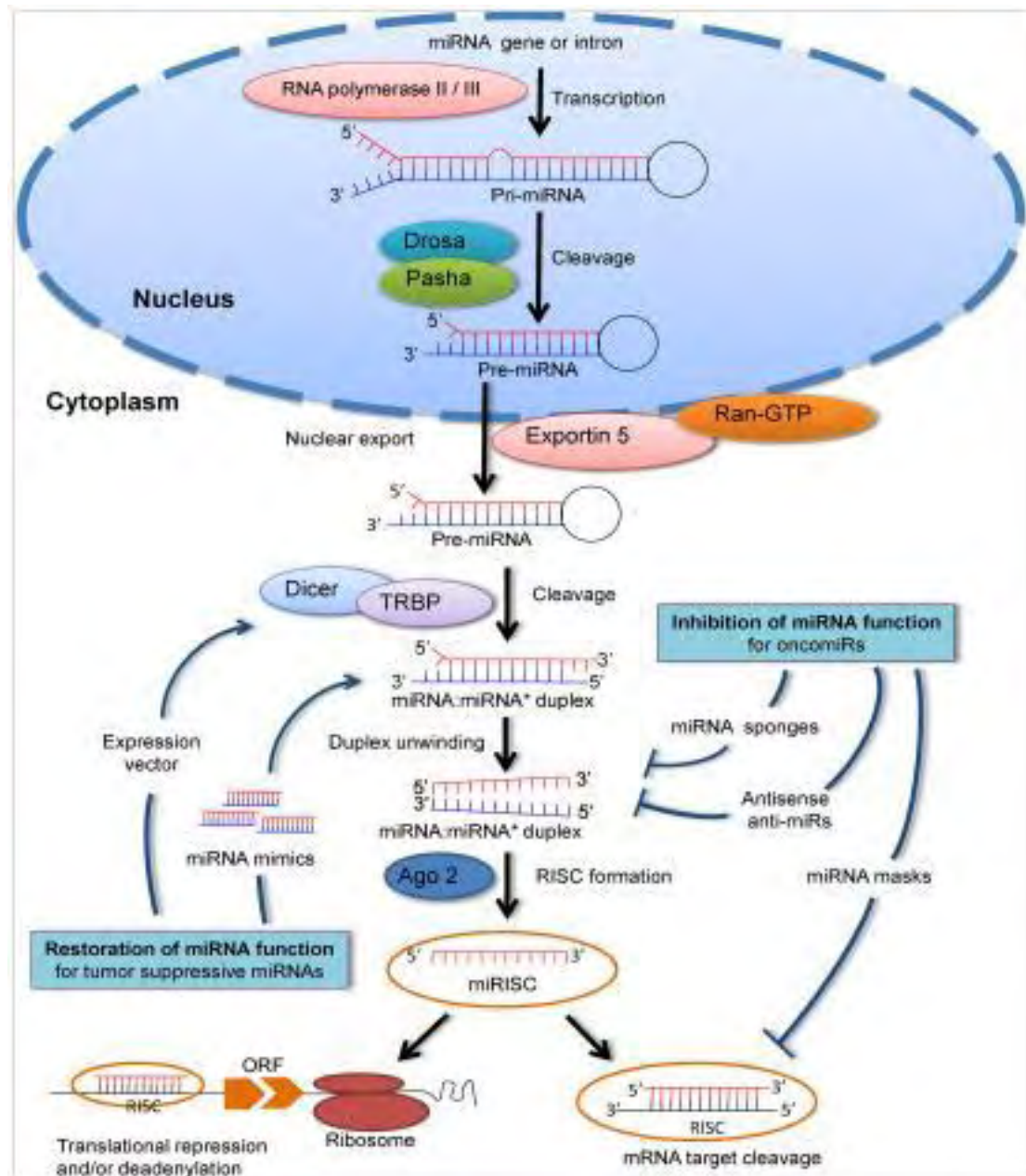
παθήσεις προέρχονται από μελέτες στον καρκίνο (Jacobsen et al. 2013, Li et al. 2014), οι οποίες έχουν συσχετίσει τα επίπεδα έκφρασης πληθώρας microRNAs με το φαινότυπο επιθετικού και μεταστατικού τύπων καρκίνων (Ma et al. 2007, Tavazoie et al. 2008), ογκοκατασταλτική ή ογκογενετική δράση υποδηλώνοντας εμπλοκή αυτών στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων (Zhang et al. 2007).

Αρκετές ερευνητικές ομάδες προτίνουν ότι τα miRNAs μπορούν να διαδραματίσουν ένα βασικό ρόλο στην OA (Yu et al. 2011, Miyaki et al. 2012, Sondag et al. 2016, De Palma et al. 2017, Zhang et al. 2017), λόγω του γεγονότος ότι η μηχανική φόρτιση των αρθρώσεων επιδρά στην έκφραση των miRNAs. Προς στήριξη αυτής της θέσης, ήταν τα στοιχεία ότι τα miRNAs ρυθμίζουν εκατοντάδες γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη του χόνδρου, την ομοιόσταση και την παθολογία της OA (Mirzamohammad et al. 2014). Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών, μετά από μετανάλυση (Wu et al. 2014), αποκάλυψαν περισσότερα από 25 miRNAs τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη του χόνδρου και της OA, και ειδικότερα miRNAs τα οποία συνδέονται με τη ρύθμιση της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων και τη σύνθεση των πρωτεολυτικών ενζύμων. Αξίζει να σημειωθεί ότι μονοπάτια που εμπλέκονται στην OA, όπως του TGF- β /SMA και Drosophila MADs (SMADs)/ BMPs (bone morphogenetic proteins), MMPs, ADAMTS, iNOS (inducible nitric acid synthase) IL-1, TNF- α , ρυθμίζονται από miRNAs (Li et al. 2016).

Επιπλέον τα παθολογικά φαινόμενα της OA, που σχετίζονται με τον εκφυλισμό του χόνδρου, συμπεριλαμβανόμενης της παχυσαρκίας, της φλεγμονής, της απόπτωσης, της αυτοφαγίας, βρέθηκαν να σχετίζονται με τη δράση των miRNAs (Musumeci et al. 2015). Ειδικότερα με την αυτοφαγία, τα miRNAs είναι πιθανό να διαδραματίζουν ρόλο στην αυτοφαγία των χονδροκυττάρων στην OA, λόγω της ικανότητας τους να ρυθμίζουν την απόπτωση (Li et al. 2016, Nugent et al. 2016) και την αντίδραση οξυγόνου (Nugent et al. 2016). Ειδικότερα miRNAs τα οποία έχουν βρεθεί να διαδραματίζουν ρόλο στην OA είναι τα mir-9, mir-27, mir-34a, mir-140, mir-558 και mir-602 (Cong et al. 2017). Στη πραγματικότητα, μερικά από αυτά τα miRNAs ταυτοποιήθηκαν ως ρυθμιστές της ιντερλευκίνης-επαγόμενης έκφρασης των MMP-13 (κολλαγονάση-3), μιας μεταλλοπρωτεϊνάσης κρίσιμη στην αποικοδόμηση του χονδρικού κολλαγόνου II (Cong et al. 2017).

Λαμβάνοντας υπόψιν τη συμμετοχή των miRNAs στη ρύθμιση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που ενέχονται στον καρκίνο,

διατυπώνεται η άποψη ότι τα συγκεκριμένα μόρια μπορούν να αποτελέσουν στόχο θεραπευτικών μοντέλων (Van et al. 2012). Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί δυο διαφορετικές στρατηγικές στη χρήση των microRNAs ως θεραπευτικούς στόχους οι οποίες βρίσκονται σε προκλινικό ή και κλινικό στάδιο και στοχεύουν τα επιμέρους βήματα της βιογένεσής τους. Συγκεκριμένα, οι προσεγγίσεις που ακολουθούνται αφορούν στην αποκατάσταση της ογκοκατασταλτικής τους δράσης αποκαθιστώντας τα μειωμένα επίπεδα τους είτε με χορήγηση συνθετικού miRNA (mimic miRNA) είτε μέσω ειδικών miRNA vectors (Garzon et al. 2010, Thum et al. 2012, Bader et al. 2011). Επιπλέον, κλινικές δοκιμές στοχεύουν σε αναστολή του miRNA μέσω antisense αντι-miRNA ολιγονουκλεοτιδίων (Garzon et al. 2010), locked νουκλεϊκά οξέα αντι-miRNA (Vester et al. 2004), miRNA sponges (Ebert et al. 2007), miRNA masks (Choi et al. 2007 και μικροί μοριακοί miRNA αναστολείς (Gumireddy et al. 2008) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Θεραπευτικές στρατηγικές και microRNAs

2.2 Βιολογικά στοιχεία στην υπολογιστική ανάλυση

Όπως προαναφέρθηκε τα miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο μέσω της πρόσδεσής τους στην 3'UTR του mRNA-στόχου. Η πρόσδεσή τους βασίζεται στον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων και έχει ως αποτέλεσμα είτε την αποικοδόμηση του mRNA και καταστολή της μεταγραφής (πλήρης συμπληρωματικότητα) είτε την αναστολή της μετάφρασης (μερική συμπληρωματικότητα). Ο τρόπος αυτός δράσης των microRNAs βασίζεται σε τρεις

θεμελιώδεις αρχές της λειτουργίας των συγκεκριμένων μορίων, α) αλληλεπίδραση μέσω μιας συμπληρωματικής αλληλουχίας με το mRNA-στόχο (Lee et al. 1993), β) η περιοχή δράσης του miRNA οριοθετείται στην 3'UTR του mRNA (Lee et al. 1993, Wightman et al. 2001) και γ) παρουσία διατηρημένων στοιχείων που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του miRNA:mRNA (Wightman et al 2001).

Τα παραπάνω στοιχεία σχετικά με τις αρχές που διέπουν τον τρόπο δράσης και λειτουργίας των miRNAs παρέχουν τη βάση για την ανάπτυξη εργαλείων βιοπληροφορικής που επιτρέπουν την πρόβλεψη των mRNA-στόχων των miRNAs. Ειδικότερα η ανάλυση που διεξάγεται με τα υπολογιστικά προγράμματα βασίζεται στις εξής παραμέτρους οι οποίες θα αναλυθούν ακολούθως: α) την αλληλουχία του miRNA, β) την 3'UTR του mRNA, γ) την ενέργεια (σταθερότητα) των συμπλόκων, δ) την 3'UTR του miRNA και ε) τις συντηρημένες αλληλουχίες (μεταξύ διαφορετικών ειδών).

2.2.1 Αλληλουχία του miRNA

Η ανάπτυξη αλγορίθμων για την εύρεση της αλληλουχίας-στόχου του miRNA προϋποθέτει την ύπαρξη βάσεων δεδομένων στις οποίες έχουν καταχωρηθεί οι αλληλουχίες των microRNAs. Η αποτελεσματικότητα των παραπάνω αλγορίθμων βασίζεται στον αριθμό των καταχωρήσεων υποδηλώνοντας μία άμεση συσχέτιση μεταξύ μεθόδου ανάλυσης (αλγορίθμου) και βάσεων. Ειδικότερα, ο μεγαλύτερος αριθμός καταχωρήσεων καθιστά την πρόβλεψη των mRNA-στόχων των εκάστοτε miRNA πιο αποτελεσματική και ισχυρή.

Μέχρι σήμερα είναι διαθέσιμες αρκετές βάσεις δεδομένων που επιτρέπουν την ανάδειξη των γονιδίων που στοχεύουν τα microRNAs, στις οποίες καταχωρούνται οι αλληλουχίες τόσο των γονιδίων όσο και των miRNAs από διαφορετικά ήδη. Μεταξύ των βάσεων που χρησιμοποιούνται σήμερα συγκαταλέγεται η βάση δεδομένων η Rfam για μη κωδικές αλληλουχίες (Nawrocki et al. 2015), η miRBase (Kozomara et al. 2014), η TarBase (Sethupathy et al. 2006) και η miRecords (Xiao et al. 2009). Παράλληλα είναι διαθέσιμα εργαλεία όπως το TargetScan (Lewis et al. 2003), ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) (Consortium et al. 2012), miRanda και DIANA τα οποία επιτρέπουν την ανάλυση μεγαλύτερου όγκου δεδομένων.

2.2.2 3' UTR περιοχή του mRNA

Η αλληλουχία του mRNA είναι απαραίτητη για τη πρόβλεψη του διμερούς miRNA:mRNA και ιδιαίτερα η 3'UTR περιοχή. Δεδομένου ότι η πρόσδεση του miRNA στο mRNA του γονιδίου-στόχου πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο στην 3'UTR περιοχή, η πλειοψηφία των υπολογιστικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής χρησιμοποιούν την αλληλουχία της συγκεκριμένης περιοχής προκειμένου να ανευρεθούν τα γονίδια-στόχοι. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι είναι δυνατόν τα miRNAs να στοχεύουν ολόκληρο το mRNA (Schnall-Levin et al. 2011). Η ανεύρεση ολόκληρης της αλληλουχίας του mRNA καθίσταται δυνατή σε βάσεις δεδομένων όπως η Ensembl (Cunningham et al. 2015), η Reference mRNA Sequences (RefSeq) (O'Leary et al. 2016) και η UCSC Genome (Karolchik et al. 2003, Karolchik et al. 2009).

2.2.3 Η αλληλουχία έναρξης

Η αλληλουχία έναρξης αποτελεί μία περιοχή ανάμεσα στα νουκλεοτίδια 2 έως 8, αριθμούμενα από το 5' στο 3' άκρο της αλληλουχίας και εμφανίζει πλήρη συμπληρωματικότητα με τη 3'UTR περιοχή του mRNA. Το 2003 χρησιμοποιήθηκε η παραπάνω περιοχή για την αναζήτηση στον αλγόριθμο TargetScan (Lewis et al. 2005), ενώ αργότερα επεκτάθηκε στον TargetScanS (Lewis et al. 2005, Friedman et al. 2009). Η περιοχή έναρξης του miRNA εμφανίζει υψηλά συντηρημένα στοιχεία το οποίο δίνει τη δυνατότητα ομαδοποίησης και ταξινόμησης των miRNAs σε οικογένειες και είδη. Για αυτόν το λόγο πολλά εργαλεία όπως το PicTar (Krek et al. 2005), PITA (Kertesz et al. 2007), RNAhybrid (Kruger et al. 2006) και miRU (Zhang et al. 2005) εμπεριέχουν την περιοχή έναρξης ως βιολογικό στοιχείο «κλειδί» για την πρόβλεψη στόχων-miRNA. Ωστόσο άλλοι αλγόριθμοι, όπως ο αλγόριθμος DIATA Tools, χρησιμοποιούν δικά τους κριτήρια για το ταίριασμα (pairing) των βάσεων. Πιο συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος DIANA Tools χρησιμοποιεί miRNA-αναγνωριστικές αλληλουχίες, το οποίο βασίζεται στο γεγονός ότι αν η συμπληρωματικότητα των βάσεων είναι μερική, η σταθερότητα συνδεσης με το mRNA-στόχο δε θα επηρεαστεί. Επιπλέον πρέπει να ληφθεί υπόψη η ύπαρξη της G:U αστάθειας στην περιοχή έναρξης διότι ενδέχεται να επηρεάζει την κατασταλτική δράση των miRNAs (Doench et al. 2004).

2.2.4 Ελεύθερη ενέργεια και παρεχόμενη ενέργεια

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η σταθερότητα των βιολογικών συστημάτων βασίζεται στους νόμους της θερμοδυναμικής, διατυπώνεται η υπόθεση ότι ο υπολογισμός της ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας είναι δυνατόν να αντιπροσωπεύει τη σταθερότητα του ζευγαρώματος των βάσεων μεταξύ του miRNA και του mRNA-στόχου. Κατ'επέκταση, λιγότερη ελεύθερη ενέργεια σηματοδοτεί σταθερότερο δέσιμο RNA:RNA, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τη πιθανότητα ότι αυτή η αλληλεπίδραση να μπορεί να συμβεί (Mathews et al. 1999, Wightman et al. 1993). Η ελεύθερη ενέργεια εκφράζεται σε αρνητική τιμή και η μονάδα της είναι kcal/mol. Για τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας, χρησιμοποιείται το Vienna RNA package (Hofacker et al. 1994, Lorenz et al. 2011) το οποίο χρησιμοποιείται από τα περισσότερα miRNA:mRNA εργαλεία πρόβλεψης. Επιπλέον προγράμματα όπως το PITA (Kertesz et al. 2007) χρησιμοποιούν την ελεύθερη ενέργεια για να υπολογίσουν την δυνατότητα να υπάρξει συμπληρωματικότητα του microRNA με την 3'UTR του mRNA. Αυτή η εκτίμηση λαμβάνει υπόψιν ότι το mRNA υιοθετεί μια δευτεροταγή δομή, ώστε να είναι προσβάσιμος ο χώρος που μπορεί να δράσει το miRNA (Kertesz et al. 2007).

2.2.5 3' περιοχή του miRNA

Μια επιπλέον παράμετρος που λαμβάνεται υπόψιν από τις βάσεις δεδομένων είναι η 3'UTR περιοχή του miRNA, η οποία συμβάλλει σημαντικά στην αποτελεσματικότητα της καταστολής της γονιδιακής έκφρασης. Επιπλέον μπορεί να δράσει και ως αντισταθμιστική αλληλεπίδραση (compensatory interaction) όταν παρατηρείται ατελές ταίριασμα (mismatch) σε αυτή τη περιοχή (Friedman et al. 2009, Doench et al. 2004, Brenneck et al. 2005, Grimson et al. 2007). Η προαναφερθείσα παράμετρος χρησιμοποιείται στα εργαλεία TargetScan (Grimson et al. 2007, Friedman et al. 2009) και miRanda (Betel et al. 2010).

2.2.6 Συντηρημένες εξελικτικά περιοχές

Χαρακτηριστικό της βιολογίας των microRNAs είναι και οι συντηρημένες εξελικτικά περιοχές. Όταν υπάρχει περιοχή πρόσδεσης του miRNA σε διαφορετικά είδη, το γεγονός αυτό υποδηλώνει συντηρημένη περιοχή η οποία μπορεί να βρίσκεται σε οποιοδήποτε σημείο στην αλληλουχία του miRNA. Η ανάλυση για την ανεύρεση συντηρημένης αλληλουχίας περιλαμβάνει τη χρήση φυλογενετικών και εξελικτικών αποστάσεων η οποία επιτρέπει την ανεύρεση λειτουργικών συμπλόκων miRNA-στόχοι

δεδομένου ότι η ανάλυση διέπεται από την αρχή της φυσικής επιλογής. Με αυτόν τον τρόπο, ο υψηλός βαθμός συντήρησης θα μπορούσε να είναι ενδεικτικός της αξιοπιστίας της πρόβλεψης (Friedman et al. 2009). Το επίπεδο συντήρησης συνιστά σημαντική παράμετρο και εμπεριέχεται στους περισσότερους αλγόριθμους πρόβλεψης των miRNA-στόχων, συμπεριλαμβανομένων του TargetScan (Nam et al. 2014), miRanda (Betel et al. 2010), DIANA-microT (Reczko et al. 2012), PicTar (Krek et al. 2005), PITA (Kertesz et al. 2007) και EIMMo (Gaidatzis et al. 2007). Ωστόσο, υπάρχουν μερικές εξαιρέσεις όπως το RNA22 εργαλείο, το οποίο εντοπίζει πιθανές περιοχές-στόχους ανεξάρτητα από το βαθμό συντήρησής τους (Miranda et al. 2006).

2.2.7 Άλλες περιοχές στόχοι

Έρευνες υποστηρίζουν ότι εκτός της 3'UTR περιοχής του γονιδίου, είναι δυνατή η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με πρόσδεση του microRNA και σε άλλες περιοχές του γονιδίου-στόχου. Μεταξύ των περιοχών συγκαταλέγονται η 5'UTR περιοχή (Orom et al. 2008, Gu et al. 2014), τα πλαίσια ανοικτού διαβάσματος (open reading frames, ORFs) (Mandkeetal 2012, Zhang et al. 2015) και οι κωδικές αλληλουχίες (CDS) των mRNAs (Guo et al. 2015), οι οποίες περιοχές συμπεριλαμβάνονται στην αναζήτηση δημιουργίας αξιόπιστων εργαλείων για εύρεση των miRNA-στόχων. Για παράδειγμα, η νέα έκδοση του DIANA microT εμπεριέχει την πρόβλεψη miRNA:MRE στη CDS περιοχή (Reczko et al. 2012). Επιπλέον το υπολογιστικό εργαλείο RNA22 εμπεριέχει τη πρόβλεψη συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων στην 3'UTR, 5'UTR και CDS περιοχές (Miranda et al. 2006). Τέλος το miRTar (Hsu et al. 2011, Xu et al. 2014) και το TargetS (Xu et al. 2014) εμπεριέχουν αυτές τις 3 περιοχές στη πρόβλεψή τους.

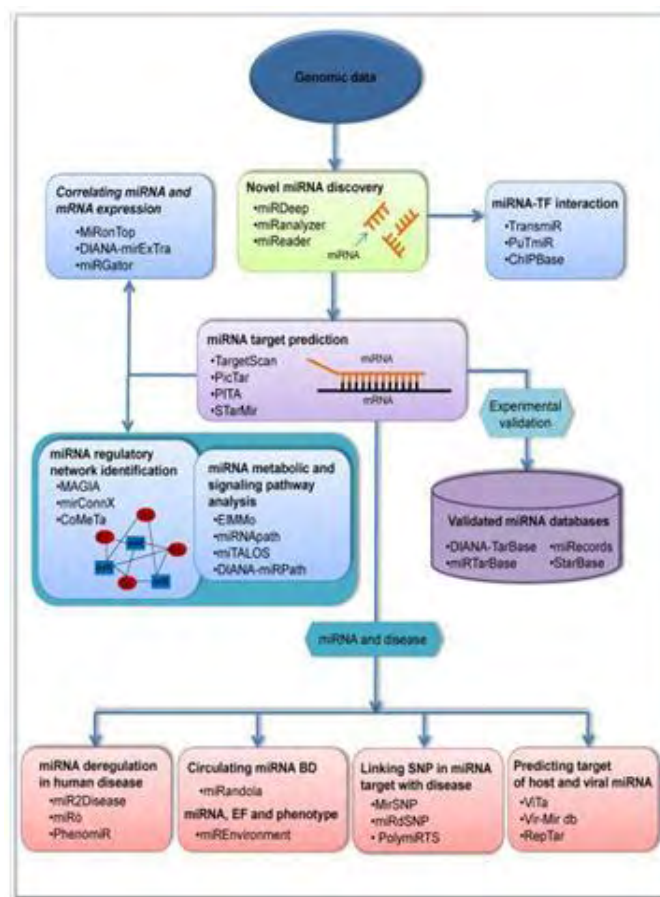
2.2.8 Τα πλαίσια

Η συγκεκριμένη παράμετρος αναφέρεται στους παράγοντες που προαναφέρθηκαν ότι επηρεάζουν την αλληλεπίδραση miRNA:mRNA, αλλά δεν εξαρτώνται άμεσα από την αναγνώριση της αλληλουχίας. Ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες που επιδρούν στην όλη διαδικασία σύνδεσης microRNA και mRNA-στόχου συμπεριλαμβάνονται η σύνδεση πρωτεϊνών στο RNA (Hafner et al. 2010) και η μεθυλίωση του RNA σε διάφορες θέσεις (Wang et al. 2014). Επιπλέον σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν αφενός η ιστοειδική δράση των miRNAs σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές και ιστούς (Nam et al. 2014), καθώς και η παρουσία των μακρών μη

κωδικών μορίων RNA, τα οποία δρουν ως καταστολείς μέσω της αλληλεπίδρασης miRNA:lncRNA (Salmena et al. 2011, Jeggari et al. 2012). Για αυτό το λόγο, η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται από τους διάφορους αλγορίθμους για την πρόβλεψη των γονιδίων-στόχων λαμβάνει υπόψιν τον βαθμός της καταστολής και τη συνεργατική δράση των miRNAs όπως γίνεται στην περίπτωση του TargetScan (Grimson et al. 2007, Nam et al. 2015, Garcia et al. 2011), ενώ τα εργαλεία miRTar και miRanda/PITA συνυπολογίζουν το εναλλακτικό μάτισμα (Hsuetal 2011) και τη δευτεροταγή δομή (Enright et al. 2003) (Kertesz et al. 2007), αντιστοίχως. Επίσης έχουν αναπτυχθεί διαδικτυακά εργαλεία τα οποία έχουν σχεδιαστεί για να εντοπίζουν μόρια ρύθμισης των miRNAs (Joung et al. 2007, Zhang et al. 2011), όπως και να προβλέπουν τους στόχους των miRNAs βασιζόμενα στην έκφραση τους (Huang et al. 2007, Huang et al. 2008).

2.3 Διαφορετικές προσεγγίσεις της βιοπληροφορικής στη μελέτη των miRNAs

Μέχρι σήμερα υπάρχει ποικιλία εργαλείων βιοπληροφορικής τα οποία έχουν αναπτυχθεί, ώστε να επιτρέπουν την επεξεργασία της ροής δεδομένων αναφορικά με τα miRNA. Τα εργαλεία αυτά περιλαμβάνουν την ανάλυση των miRNA τόσο σε επίπεδο πρόβλεψης των γονιδίων-στόχων, όσο και την ανάλυση της έκφρασής τους. Επιπλέον παρέχουν πληροφορίες για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν και ρυθμίζονται από τα microRNA, τις βιολογικές διεργασίες στις οποίες ενέχονται τα miRNA και τα γονίδια-στόχοι τους, καθώς επίσης επιτρέπουν την ανεύρεση πιθανών αλληλεπιδράσεων των microRNAs με άλλα μόρια όπως μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των διαθέσιμων βιοπληροφορικών εργαλείων (Akhtar et al. 2015)

2.4 Αναγνώριση των miRNAs

Η ταυτοποίηση των miRNAs είναι μια περίπλοκη διαδικασία που συμβάλλει στην κατανόηση της λειτουργίας και σημασίας των microRNAs. Μέχρι σήμερα η ανάπτυξη της βιολογίας επιτρέπει την εύκολη διερεύνηση του μοτίβου έκφρασης των διαφόρων miRNAs (Milagro et al 2013). Τα τελευταία χρόνια, η βιολογική και η βιοπληροφορική προσέγγιση, παρείχαν τη δυνατότητα ανακάλυψης χιλιάδων miRNAs από φυτά, ζώα, μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Siomi et al 2010) και ιούς (Li et al. 2008). Αυτά τα δεδομένα είναι συγκεντρωμένα στη βάση miRBase, την κύρια διαδικτυακή βάση δεδομένων αλληλουχίας miRNAs. Σήμερα η miRBase περιέχει 24.521 miRNAs (30424 ώριμα miRNA) από 206 είδη, συμπεριλαμβανομένων 1872 ανθρώπινης προέλευσης τα οποία παράγουν 2578 ώριμα miRNAs (Kozomatra et al. 2014). Στις τεχνικές εύρεσης miRNAs συμπεριλαμβάνονται η κλωνοποίηση (Bentwich et al. 2005), το στύπωμα κατά Northern (Varallyay et al. 2007), η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays) (Liu et al. 2004) και in situ υβριδοποίηση (Nelson et al. 2006) τα οποία είναι χρονοβόρα και περιορισμένης αποτελεσματικότητας (Mendes et al. 2009). Τα παραπάνω μειονεκτήματα αντιμετωπίζονται με την

τεχνολογία της αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS), η οποία είναι μια αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος για την ποσοτικοποίηση των miRNAs και την ανίχνευση των λιγότερων συχνών (Bar et al. 2008). Έχουν αναπτυχθεί αρκετοί αλγόριθμοι οι οποίοι εφαρμόζονται για την ανεύρεση νέων miRNAs από τα δεδομένα που προκύπτουν από την NGS τεχνολογία. Αυτά τα εργαλεία λαμβάνουν υπόψιν τους κάποια κύρια γνωρίσματα των miRNAs όπως είναι οι συντηρημένες αλληλουχίες ανάμεσα στα είδη, η δομή φουρκέτας και η ελάχιστη ελεύθερη ενέργεια (Li et al. 2010).

Νεότερες βιοπληροφορικές μέθοδοι προβλέπουν πιθανά miRNAs από τη γονιδιακή αλληλουχία, στοχεύοντας στην δευτεροταγή δομή του RNA, όπως συντηρημένες δομές φουρκέτας, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές στα πρόδρομα miRNA συγγενικών ειδών. Το Mirscan (Lim et al. 2003) και το miRseeker (Lai et al. 2003) είναι εργαλεία που στοχεύουν σε συντηρημένες αλληλουχίες οι οποίες μπορούν να δώσουν δομή φουρκέτας βασισμένα στο RNAfold και Mfold, αντίστοιχα. Το MiRscan συγκρίνει αναγνωρισμένες δομές με γνωστά χαρακτηριστικά των miRNAs όπως τα 3'-5' συντηρημένα άκρα, ενώ το miRseeker αναγνωρίζει δομές φουρκέτας. Το MiRscan και το miRseeker ήταν τα πρώτα που εφαρμόστηκαν στην αναγνώριση miRNAs νηματωδών και μυγών αντίστοιχα, και στον εντοπισμό μεγάλου αριθμού πιθανών υποψήφιων μορίων, τα οποία αργότερα επιβεβαιώθηκαν πειραματικά.

Ωστόσο, η δυναμική αυτών των εργαλείων βασιζόμενα σε συγκριτικές μεθόδους περιορίζεται σε εξελικτικά συντηρημένα mRNAs, ενώ υπάρχει περιορισμός στην εύρεση νέων miRNAs. Το τελευταίο μειονέκτημα αντιμετωπίζεται σήμερα με την ανάπτυξη μεθόδων μηχανικής μάθησης. Οι αλγόριθμοι της μηχανικής μάθησης επιτρέπουν στους υπολογιστές να μαθαίνουν από πληροφορίες, οι οποίες συλλέγονται από προηγούμενα επιβεβαιωμένα miRNAs και χρησιμοποιούνται ως θετικά πρότυπα για την αναγνώριση των νέων miRNAs. Οι αλγόριθμοι εμπεριέχουν ένα φυλογενετικό hidden Markov μοντέλο (HMM), μοντέλο Naive Bayes (Naive Bayes classifier - NBC) και μηχανές διανυσμάτων υποστήριξης (support vector machine - SVM) (Mendes et al. 2009). Το μοντέλο HMMs αναγνωρίζει μοτίβα μεταξύ των δεδομένων σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (Agarwal et al. 2010). Το μοντέλο Naive Bayes συνιστά ένα μοντέλο ταξινόμησης όπου διέπεται από την εφαρμογή μιας σχετικά απλής μεθόδου στον όγκο των δεδομένων και υπολογίζει τη πιθανότητα ένα δείγμα να ανήκει σε κάποια κλάση (Mitchell et al. 1997, Yousef et al. 2007). Ο SVM είναι ένας ταξινομητής, ο οποίος κατηγοριοποιεί τα αντικείμενα με βάση την εικόνα κάθε αντικειμένου. Συγκρίνει διανυσματικά από μία θετική και μία αρνητική ταξινόμηση

και παρέχει ένα υπερπλάνο, δίνοντας το καλύτερο διαχωριστικό όριο ανάμεσά τους (Ben-Hur et al. 2010, Sheng et al. 2007). Αρκετά εργαλεία βασισμένα με αυτή τη προσέγγιση έχουν αναπτυχθεί για την πρόβλεψη miRNAs για διαφορετικά είδη. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει το ProMir (Nam et al. 2005), ένα HMM εργαλείο, πιθανολογικής συνεργατικής μάθησης βασισμένο σε συντηρημένες αλληλουχίες και δευτεροταγή δομή και χρησιμοποιείται για πρόβλεψη ανθρώπινων miRNA γονιδίων. Επιπλέον είναι δυνατή η πρόβλεψη τόσο συντηρημένων όσο και μη-συντηρημένων miRNA γονιδίων με εφαρμογή συγκεκριμένων φίλτρων/κριτηρίων. Επίσης το MiRRim (Teraï et al. 2007) είναι ένα ακόμα HMM εργαλείο το οποίο λαμβάνει υπόψιν τα εξελικτικά δεδομένα και τη δευτεροταγή δομή των miRNA γονιδίων πετυχαίνοντας υψηλής απόδοσης ταυτοποίηση νέων ανθρώπινων miRNAs. Το HHMMiR (Kadri et al. 2009), προβλέπει de novo miRNA φουρκέτες με απουσία εξελικτικής συσχέτισης. Η μέθοδος εφαρμόζει ένα ιεραρχικό HMM, αξιοποιώντας περιοχές της δομής όπως επίσης και της αλληλουχίας των πρόδρομων miRNAs. Ένα ακόμη εργαλείο είναι το SSC profiler (Oulas et al. 2009, Oulas et al. 2011), αξιοποιώντας μία πιθανολογική μέθοδο βασισμένη στο Profile HMMs, ικανό να αναγνωρίζει βιολογικά στοιχεία του miRNA όπως η αλληλουχία, η δομή, τη συντήρηση, ώστε να ταυτοποιεί νέα ώριμα miRNAs.

Το MiRFinder (Huang et al. 2007) είναι ένα SVM εργαλείο το οποίο συγκρίνει γονίδια και ζεύγη αλληλουχιών ανάμεσα σε συγγενικά είδη. Ταυτοποιεί τη δομή της φουρκέτας από μια σειρά υποψήφιων miRNAs και αποκλείει μη πιθανές δομές από την SVM ανάλυση των 18 διαφορετικών παραμέτρων. Το NBC-εργαλείο BayesmiRNAfind (Yousef et al. 2006) είναι μια υπολογιστική προσέγγιση η οποία προβλέπει γνωστά miRNAs με βάση την δευτεροταγή δομή και την αλληλουχία τους, για ένα συγκεκριμένο γονιδίωμα που εμείς θέλουμε. Επίσης, ένα άλλο υπολογιστικό εργαλείο είναι το MatureBayes (Gkirtzou et al. 2010), το οποίο εντοπίζει υποψήφια ώριμα miRNA, βασισμένο στην αλληλουχία και στη δευτεροταγή δομή των πρόδρομων τους miRNA. Η μέθοδος προβλέπει την θέση έναρξης των πειραματικώς επιβεβαιωμένων, ώριμων miRNAs ανθρώπου και ποντικού, λαμβάνει υπόψιν μαζί θετικά (επαληθευμένα ώριμα miRNAs) και αρνητικά (ίδου μεγέθους μη-ώριμες miRNA αλληλουχίες) ως παραδείγματα, ώστε να βελτιστοποιήσει την ειδικότητα και ευαισθησία του. Είναι σαφώς πιο ακριβές από το ProMir και το BayesMiRNAfind (Gkirtzou et al. 2010).

Αρκετά εργαλεία έχουν αναπτυχθεί ώστε να προβλέψουν miRNAs από δεδομένα νέας γενιάς αλληλούχισης. Τα πιο συνηθισμένα είναι το miRDeep/miRDeep2 (Friedlander et al. 2008, Friedlander et al. 2012) και το miRanalyzer (Hackenberg et al. 2009), Hackenberg et al. 2011), ο συνδυασμός των οποίων επιτρέπει την ανεύρεση γνωστών και νέων miRNAs. Ένα άλλο εργαλείο είναι και το miReader (Jha et al. 2013), το οποίο αναγνωρίζει ώριμα miRNAs απευθείας από ανάγνωση δεδομένων NGS, χωρίς να χρειάζεται γενωμική αλληλούχιση ή ομόλογες αλληλουχίες. Πειραματικές τεχνικές όπως η μοριακή κλωνοποίηση, η αλληλούχιση ή η υβριδοποίηση είναι τυπικές για την επιβεβαίωση των ευρημάτων (Huang et al. 2011).

Η εξακρίβωση των βιολογικών λειτουργιών των νέων miRNAs που ανακαλύπτονται με αυτά τα εργαλεία απαιτούν επιπλέον βιοπληροφορική ανάλυση. Τα εργαλεία αυτά όπως TargetScanv5.2 (Lewis et al. 2005), MiRDB (Wong et al. 2014), DIANA-microT (Maragkakis et al. 2009), RNAhybrid (Kruger et al 2006), Miranda (Pfeffer et al. 2004), εμπεριέχουν λειτουργίες ώστε να προβλέπουν τα πιθανά miRNAs ή στόχους αυτών.

2.5 Εργαλεία για την πρόβλεψη γονιδίων-στόχων των miRNAs

Ένα μόριο miRNA μπορεί να στοχεύει στη λειτουργία πολλών γονιδίων, όπως επίσης αρκετά miRNA μπορούν να δρουν σε ένα και μόνο γονίδιο (Thomson et al. 2011). Σε αντίθεση με τα miRNAs των φυτών όπου έχουμε συνήθως πλήρη συμπληρωματικότητα με τους στόχους τους (Zhang et al. 2005), στα ζωικά miRNAs έχουμε μειωμένη ευαισθησία ως προς την αλληλουχία, το οποίο και δυσκολεύει το προσδιορισμό των στόχων των miRNAs με υψηλή ακρίβεια (Ambros et al. 2004). Τα 2-7 νουκλεοτίδια στην 5' περιοχή των miRNAs αποτελούν κρίσιμη περιοχή για τη δράση των miRNAs. Οι περισσότεροι διαθέσιμοι αλγόριθμοι χρησιμοποιούν συμπληρωματικότητα κατά Watson-Crick με τα μόρια των στόχων (Bartel et al. 2009), ενώ αλγόριθμοι που εξαρτώνται σε απλή συμπληρωματικότητα ανά βάση, σχετίζονται με υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Bartel et al. 2009). Η συνεχής μελέτη σχετικά με τη δράση και λειτουργία των miRNAs συμβάλει στην ανάπτυξη νέων αλγορίθμων για τη μελέτη των microRNAs αλλά και την εξέλιξη των υπάρχοντων, καθώς βελτιώνει σημαντικά την αποτελεσματικότητά τους. Δεδομένου ότι η επιβεβαίωση πιθανών στόχων των miRNAs στο εργαστήριο είναι δαπανηρή και χρονοβόρα καθώς ένα miRNA ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων, η υπολογιστική προσέγγιση βοηθάει ώστε να μειωθεί σημαντικά η ανάγκη για

πειραματική επιβεβαίωση των γονιδίων-στόχων και κατ'επέκταση του κόστους και του χρόνου για την παραπάνω διαδικασία.

Μέχρι σήμερα, έχει αναπτυχθεί σημαντικός αριθμός διαδικτυακών υπολογιστικών εργαλείων για τη πρόβλεψη των πιθανών mRNA-στόχων των microRNAs (Bartel et al. 2009, Rajewsky et al. 2006, Maziere et al. 2007).

Το **TargetScan** (Friedman et al. 2009, Lewis et al. 2005, Agarwal et al. 2015) είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο το οποίο προβλέπει στόχους των miRNA αναζητώντας για συντηρημένες και μη-συντηρημένες περιοχές. Αυτό εντοπίζει στόχους στην 3'UTR περιοχή των mRNA μέσω της συμπληρωματικότητας των βάσεων, όπως και τη δευτεροταγή δομή για να υπολογίσει την ελεύθερη ενέργεια των προβλεπόμενων διμερών. Το **PicTar** (Lall et al. 2006) αναγνωρίζει περιοχές αλληλεπίδρασης για ένα miRNA και πολλαπλές θέσεις ελεγχόμενες από διαφορετικά miRNAs τα οποία δρουν συνεργατικά. Συγκεκριμένα χρησιμοποιεί έναν αλγόριθμο στοίχισης προκειμένου να εντοπίσει συντηρημένες περιοχές μεταξύ των διαφόρων ειδών. Επίσης για να βελτιώσει την πρόβλεψη λαμβάνει υπόψιν ομάδες miRNAs τα οποία μπορεί να εκφράζονται στον ίδιο ιστό και να έχουν κοινά γονίδια-στόχους. Το RNAhybrid (Kruger et al. 2006, Rehmsmeier et al. 2004) προβλέπει πολλές δυνητικές θέσεις των miRNAs και λαμβάνει υπόψιν την ελεύθερη ενέργεια του διμερούς miRNA:mRNA. Αντίθετα, το rna22 (Miranda et al. 2006, Loher et al. 2012) βασίζεται στην αναγνώριση προτύπων, ώστε να βρει τις θέσεις πρόσδεσης των miRNAs χωρίς να λαμβάνει υπόψιν το φιλτράρισμα των συντηρημένων αλληλουχιών ανάμεσα στα είδη.

Όσο αφορά το εργαλείο **PITA** (Kertesz et al. 2007), ο κύριος τρόπος για τη πρόβλεψη των mRNA-στόχων είναι η πρόσβασιμότητα των θέσεων στόχων. Αυτή είναι μία παράμετρος για την αλληλεπίδραση του miRNA-στόχου η οποία υπολογίζει τη διαφορά ανάμεσα στην ελεύθερη ενέργεια που αποκτάται από το σύμπλοκο miRNA-στόχο και του κόστος ενέργειας από το μη ζευγάρωμα του στόχου, το οποίο θα το κάνει προσβάσιμο στο miRNA. Μία επιπλέον βάση δεδομένων για την πρόβλεψη των γονιδίων-στόχων των microRNAs είναι η MiRDB (Wang et al. 2008, Wong et al. 2014). Πρόκειται για ένα SVM εργαλείο μηχανικής μάθησης το οποίο παρέχει επίσης πληροφορίες για τη λειτουργία κυρίως των ώριμων miRNA. Το **microRNA.org** προβλέπει πιθανούς στόχους χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο miRanda και βαθμολογώντας τα miRNAs, μέσω της mirSVR μηχανικής μεθόδου μάθησης, για τη δραστηρότητά τους να καταστέλλουν γονίδια-στόχους (Betel et al. 2010). Το **MiRanda** αναγνωρίζει θέσεις στόχους χρησιμοποιώντας την συμπληρωματικότητα της

αλληλουχίας ανάμεσα στα ώριμα miRNAs και την ελεύθερη ενέργεια του διμερούς (Pfeffer et al. 2004).

Το **DIANA-microT-CDS** (Maragkakis et al. 2009, Maragkakis et al. 2011, Paraskevoopoulos et al. 2013) είναι η νεότερη έκδοση του DIANA-microT, ενός αλγορίθμου ο οποίος συνδυάζει προσέγγιση μηχανικής μάθησης για να ταυτοποιήσει τα περισσότερο σχετικά χαρακτηριστικά που εξάγονται από PAR-CLIP δεδομένων (photoactivatable-ribonucleoside-enhanced cross-linking immunoprecipitation) (Hafner et al. 2010). Αυτό επιτρέπει στον αλγόριθμο να αναδεικνύει τα χαρακτηριστικά τα οποία σχετίζονται με τα miRNAs, τα οποία συνδέονται σε θέσεις γνωστές ως CDS και 3'UTR. Για την πρόβλεψη του στόχου χρησιμοποιούνται κριτήρια όπως ο βαθμός της κατηγορίας του συμπλόκου, η απόσταση από το κοντινότερο άκρο της περιοχής CDS ή 3'UTR ή διπλανή περιοχή σύνδεσης, η ελεύθερη ενέργεια του συμπλόκου, η συντήρηση και παρουσία AU. Παρόλο που το DIANA-microT είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο, οι περισσότεροι χρήστες χρησιμοποιούν το Taverna, το οποίο παρέχει επιπλέον επιλογές και μη-διαδικτυακό περιβάλλον. Το STarMir (Rennie et al. 2014) εφαρμόζει υπολογιστικά μοντέλα πρόβλεψης βελτιωμένα με δεδομένα σχετικά με miRNA:mRNA σύμπλοκα, προερχόμενα από CLIP (Liu et al. 2013) έρευνες. Προκειμένου να επιτευχθεί η πρόβλεψη μέσω του STarMir, ο αλγόριθμος που εφαρμόζεται συνδυάζει την αλληλουχία, τη θερμοδυναμική, τη δομή του στόχου και την πιθανότητα σύνδεσης για κάθε μία 3'UTR, CDS και 5'UTR περιοχή.

Παρόλη την ανάπτυξη πληθώρας αλγορίθμων, οι ερευνητές συναντούν δυσκολίες στην επιλογή του κατάλληλου αλγορίθμου δεδομένου ότι κάθε πλατφόρμα έχει διαφορετικό μοντέλο και λογική πρόβλεψης. Επομένως, είναι απαραίτητο να λαμβάνονται υπόψη η λογική της μεθόδου που ακολουθεί κάθε πλατφόρμα, καθώς και οι περιορισμοί του κάθε εργαλείου, ώστε να μην υπάρχουν ψευδώς θετικά ή αρνητικά δεδομένα. Για παράδειγμα, στην περίπτωση που ένα εργαλείο βασίζεται στη στοίχιση για την επιλογή του στόχου του miRNA, είναι απίθανο να δείξει αν η ακολουθία εμφανίζει εξελικτική συντήρηση ή όχι. Ως εκ τούτου, η πρόβλεψη του γονιδίου-στόχου είναι βασισμένη στην εξέλιξη χωρίς να ληφθούν υπόψη οι αλληλεπιδράσεις miRNA:mRNA.

Επίσης σημαντική παράμετρος των διαφόρων εργαλείων που χρησιμοποιούνται στη βιοπληροφορική ανάλυση των microRNAs είναι η συνέχης τους ενημέρωση καθώς η ονοματολογία αλλάζει συνεχώς και νέα miRNA προστίθενται στη miRBase κάθε χρόνο. Στην παρούσα miRBase έκδοση v21, 278 ανθρώπινα miRNAs ταυτοποιήθηκαν

με δομική ανάλυση των πρόδρομων miRNAs σε συνδυασμό με ποσοτικοποίηση της έκφρασης τους. Χαρακτηριστικά, το RNAhybrid χρησιμοποιεί μια παλαιά φόρμα και δεν μπορεί να υποστηρίξει σύνθετες παραμέτρους, ενώ το PITA έχει να αναβαθμιστεί εδώ και 5 έτη. Άλλα εργαλεία όπως το DIANA-microT-CDS, το miRDB, το TargetScan, rna22, STarMir είναι αναβαθμισμένα (Akhtar et al. 2015).

Υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν ότι miRNA είναι δυνατόν να ρυθμίζουν την έκφραση ενός γονιδίου με την πρόσδεσή τους σε περιοχές που εντοπίζονται μέσα σε κωδικές αλληλουχίες (Reczko et al. 2012). Ως εκ τούτου γίνεται αντιληπτό ότι εργαλεία τα οποία προβλέπουν τους στόχους μόνο σε συντηρημένες 3'UTR περιοχές, θεωρούνται ακατάλληλα να προβλέψουν την miRNA:mRNA αλληλεπίδραση σε άλλη περιοχή. Αντίθετα στο DIANA-microT-CDS μπορούν να ταυτοποιηθούν miRNA στόχοι σε CDSs όπως επίσης και σε 3'UTR, και τα rna22, miRDB και STarMir μπορούν να το κάνουν και σε CDSs, 5'UTRs, 3'UTRs.

2.6 Εύρεση των γονιδίων στόχων των miRNA που έχουν επαληθευτεί πειραματικά

Σημαντικό βήμα στην βιοπληροφορική ανάλυση των miRNAs αποτελεί το γεγονός ότι παρόλη την αποτελεσματικότητα και αξιοπιστία των διαφόρων υπολογιστικών εργαλείων, τα αποτελέσματά τους θα πρέπει να επιβεβαιωθούν και πειραματικά. Η πειραματική επιβεβαίωση των ευρημάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή διαφόρων τεχνικών μοριακής βιολογίας. Οι πιο εδραιωμένες τεχνικές για πειραματική επαλήθευση είναι η ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματικού χρόνου (quantitative Real-time PCR, qRT-PCR), η μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης και η ανοσοαποτύπωση western blotting. Επιπλέον, είναι σήμερα διαθέσιμες τεχνικές υψηλής απόδοσης αλληλούχισης (HITS) όπως η πρωτεομική (proteomics) και η τεχνολογία των microarrays, ενώ μεθοδολογίες με βάση την αλληλούχιση είναι, η RNA-Seq, HITS-CLIP, PAR-CLIP και Degradome-Seq (Thomson et al. 2011).

Το **DIANA-TarBase** (Vergoulis et al. 2012, Vlachos et al. 2015) είναι μία μη αυτοματοποιημένη βάση δεδομένων για στόχους που έχουν επαληθευτεί πειραματικά. Στη τελευταία της ενημέρωση (v7.0) εμπεριέχει περισσότερο από μισό εκατομμύριο αλληλεπιδράσεις miRNA-στόχων (MTIs), προερχόμενα από δημοσιευμένες έρευνες που περιλαμβάνουν 356 διαφορετικούς τύπους κυττάρων και 24 είδη. Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων περιέχει 9 με 250 φορές περισσότερες εγγραφές από κάθε άλλη

σχετική βάση, καθώς επίσης περιλαμβάνει δεδομένα από 154 CLIP-Seq/CLASH δεδομένα, όπως επίσης και πάνω από 100 άλλα σύνολα δεδομένων υψηλής απόδοσης. Η βάση επιτρέπει την ανάκτηση των θετικών και των αρνητικών πειραματικών αποτελεσμάτων, την πειραματική μέθοδο, τις συνθήκες και τον τύπο του ιστού/κυττάρων και τη θεραπεία. Σημαντικό πλεονέκτημα της DIANA-TarBase αποτελεί το γεγονός ότι οι ομάδες δεδομένων έχουν ελεύθερη πρόσβαση.

Το **miRTarBase** (Hsu et al. 2010, Hsu et al. 2014) εμπεριέχει περισσότερα από 50000 MTI από 18 είδη, τα οποία επιλέγονται με μη αυτόματο τρόπο από τη σχετική βιβλιογραφία ύστερα από ανάλυση των άρθρων και την επιλογή ερευνών σχετικών με miRNAs. Τα MTIs επιβεβαιώνονται μέσα από πειράματα με τη χρήση microarray, western blotting και μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Η miRTarBase παρέχει μία ενημερωμένη συλλογή μέσα από σύγκριση με παρόμοιες, παλαιότερες βάσεις. Η **MiRecords** (Xiao et al. 2009) είναι επίσης μια μη αυτόματη βάση που συμπεριλαμβάνει 2705 καταγραφές των αλληλεπιδράσεων μεταξύ 644 miRNA και 1901 στόχων γονιδίων σε 9 ζωικά είδη. Επίσης περιλαμβάνει πρόβλεψη στόχων χρησιμοποιώντας 11 διαφορετικούς αλγορίθμους. Ένα άλλο εργαλείο, το **StarBase** (Yang et al. 2011, Li et al. 2014), είναι σχεδιασμένο για πολλαπλές εργασίες και εμπεριέχει αλληλεπιδράσεις miRNA:mRNA βασισμένα σε CLIP-Seq δεδομένα. Ανάμεσα στις βάσεις δεδομένων που περιέχουν επιβεβαιωμένα miRNA είναι η DIANA-TarBase, η οποία έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα ενημέρωσης και συνδέεται με τη προηγούμενη έκδοση της miRBasev21, η οποία προσφέρει High-Confidence miRNA ομάδες. Επίσης υποστηρίζει το μεγαλύτερο αριθμό ειδών και καταγραφών.

2.7 Συσχέτιση των miRNAs και της έκφρασης των mRNAs.

Παρά το γεγονός ότι σημαντικός αριθμός microRNAs έχει συσχετιστεί με παθήσεις, ο μοριακός μηχανισμός και οι διεργασίες οι οποίες ρυθμίζονται από τα miRNAs δεν έχουν αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα (Akhtar et al. 2015). Περαιτέρω αναλύσεις οι οποίες θα παρήχαν πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των miRNAs και τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία ρυθμίζουν, καθώς και δεδομένα για την έκφρασή τους, θα βελτίωνε σημαντικά την ανάδειξη των γονιδίων-στόχων τους και κατ'επέκταση την εμπλοκή τους στην παθοφυσιολογία αρκετών ασθενειών. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, σήμερα είναι διαθέσιμες αρκετές διαδικτυακές εφαρμογές βιοπληροφορικής οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα να αναδειχθούν οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες ενέχονται τα υπό μελέτη microRNAs.

Το **MiRonTop** (LeBrigand et al. 2010) είναι μία διαδικτυακή εφαρμογή σε γλώσσα Java, η οποία βασίζεται σε DNA microarrays ή HITS δεδομένα, αναγνωρίζει τα πιθανά miRNAs που σχετίζονται με ένα βιολογικό σύστημα. Η εφαρμογή παρέχει γρήγορο χαρακτηρισμό των πιο σημαντικών mRNA-στόχων, σε συμφωνία με αρκετές προσεγγίσεις πρόβλεψης. Επίσης παρέχει την επιλογή για εκτίμηση ενισχυμένης βαθμολογίας σύμφωνα με τη χωρική κατανομή των προβλεπόμενων θέσεων κατά μήκος μετάφρασης, όπως η ακριβής θέση που μπορεί να προτιμάται γύρω από τη περιοχή των κωδικονίων λήξης και της ουράς polyA. Επιπλέον παρέχει γραφήματα των miRNAs ενισχυμένης σύνδεσης με ενίσχυση/ καταστολή του ελέγχου των μεταγράφων, πίνακες των επιλεγμένων mRNA στόχων και της λειτουργία τους σύμφωνα με την Gene Ontology.

Το **DIANA-mirExTra** (Alexiou et al. 2010) είναι μια διαδικτυακή παροχή η οποία αναγνωρίζει κυρίως τα miRNAs τα οποία προκαλούν γονιδιακή απορρύθμιση μέσω στόχευσης ενός εξαμερούς τα οποία υπερ-παρουσιάζονται στην 3'UTR αλληλουχία των απορρυθμισμένων γονιδίων. Όταν τα επιθυμητά miRNAs εντοπίζονται, οι χρήστες μπορούν με ακρίβεια να λάβουν τους προβλεπόμενους στόχους ως παράγωγα από το DIANA-microT 3.0 (Maragkakis et al. 2009). Προκειμένου να ελεγχθεί πώς ένα απορρυθμισμένο γονίδιο συμβάλλει στην εξέλιξη μια ασθένειας, υπάρχει το εργαλείο **DIANA-mirPath** (Vlachos et al. 2012), το οποίο προβλέπει βιολογικά μονοπάτια στα οποία τα miRNA και τα γονίδια-στόχοι τους είναι περισσότερο πιθανό να μετέχουν.

Το **mESAdb** (Kaya et al. 2011) είναι ένα διαδραστικό και δυναμικό αναλυτικό εργαλείο, το οποίο χρησιμοποιεί την αλληλουχία του miRNA και δεδομένα έκφρασης από πολλαπλές πηγές. Το mESAdb επιτρέπει α) την επεξεργασία δεδομένων έκφρασης επιλεγμένων ομάδων miRNA, β) την ανάλυση στοίχισης πολλαπλών μεταβλητών ανάμεσα και μέσα στις λίστες των miRNA και γ) τη σύνδεση των miRNA-λιστών ή των miRNAs με μοτίβα και βάσεις όπως HUGENavigator (Khoury et al. 1998), KEGG (Kanehisa et al. 2000) και GO (Ashburner et al. 2000). Η ικανότητα αποθήκευσης δεδομένων και ανάλυσης κατά την επιθυμία του χρήστη καθιστά το mESAdb ένα σημαντικό εργαλείο. Τέλος το **miRGatorv3.0** (Cho et al. 2013) είναι εργαλείο το οποίο συλλέγει δεδομένα βαθιάς αλληλούχισης, περιλαμβάνοντας πληροφορίες για την ποικιλομορφία των miRNAs, το προφίλ έκφρασης, τη σύνδεση με τους στόχους και ποικίλα υποστηρικτικά εργαλεία. Επίσης συνδέεται με την miRBasev18.

2.8 Ανάλυση των σηματοδοτικών και μεταβολικών μονοπατιών των miRNAs

Είναι γνωστό ότι τα microRNAs μπορεί να ρυθμίζουν αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια που αφορούν σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η οργάνωση του κυτταροσκελετού και ο μεταβολισμός (Cui et al. 2006) (Tibiche et al. 2008), ενώ επίσης αλληλεπιδρούν με ένα πλήθος παραγόντων (Yu et al. 2008) μέσω των οποίων δρουν επηρεάζουν σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου. Επιπλέον το γεγονός ότι τα miRNAs ρυθμίζουν πολλά γονίδια γεγονός που υποδηλώνει και την ταυτόχρονη εμπλοκή τους σε παράλληλα βιολογικά μονοπάτια ενισχύει τη σημασία τους για την εμφάνιση και εξέλιξη παθήσεων. Παρόλο που υπάρχουν ολοένα και αυξανόμενα δεδομένα για τη συμμετοχή των miRNAs σε βασικές βιολογικές διεργασίες, η αλληλεπίδραση στα βιολογικά μονοπάτια είναι υπό μελέτη. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορα εργαλεία βιοπληροφορικής που επιτρέπουν τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων των miRNAs με διάφορα μονοπάτια.

Το **EIMMo** (Gaidatzis et al. 2007) είναι ένας Bayesian-αλγόριθμος οποίος προβλέπει στόχους χρησιμοποιώντας εξελικτική συσχέτιση, ανάλυση μονοπατιών και αλληλουχία από όλους τους εξελικτικούς κλάδους των ειδών. Ο αλγόριθμος αυτόματα συμπεραίνει τη φυλογενετική κατανομή των λειτουργικών θέσεων κάθε miRNA. Συνδυάζοντας τη πρόβλεψη με ανάλυση μονοπατιών, προτείνει λειτουργίες για συγκεκριμένα miRNAs στην εξέλιξη του νευρικού συστήματος, στην ενδοκυτταρική επικοινωνία και την κυτταρική ανάπτυξη.

Το **MiRNApath** (Chiromatzo et al. 2007) είναι μία διαδικτυακή βάση δεδομένων η οποία χρησιμοποιεί γονίδια-στόχους των miRNAs για να συνδέσει τα miRNAs με μεταβολικά μονοπάτια. Επιπρόσθετα, παρέχει 5 υπηρεσίες αναζήτησης και download. Υπάρχει ξεχωριστή εισαγωγή για κάθε αναζήτηση, η οποία μπορεί να είναι λίστα από γονίδια-στόχοι, miRNAs ή μεταβολικά μονοπάτια. Επιπλέον σύνδεσμοι παρέχουν βαθύτερου επιπέδου ανάλυσεις και σύνδεση με άλλες βάσεις με περισσότερες λεπτομέρειες.

Το **miTALOS** (Kowarsch et al. 2011) είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο το οποίο ειδικεύεται στα miRNAs που μετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιεί ιστοειδικά δεδομένα έκφρασης των miRNAs και των γονιδίων-στόχων για να βελτιώσει την ανάλυση. Το miTALOS αναγνωρίζει πιθανά μονοπάτια ρύθμισης με βάση α) μία ενισχυμένη ανάλυση των γονιδίων-στόχων των miRNA και β) χρήση προσεγγιστικής βαθμολογίας για να υπολογίσει το λειτουργικό ρόλο των miRNAs στα βιολογικά μονοπάτια μέσω των γειτονικών δικτύων που μετέχουν.

Το **MiRSystem** (Lu et al. 2012) επιτρέπει την ανεύρεση των γονιδίων-στόχων των miRNA, την πρόβλεψη τη βιολογικής λειτουργίας τους και κανονικοποίηση των μονοπατιών των miRNAs και των γονιδίων-στόχων. Τέλος υπάρχει το εργαλείο **DIANA-miRPath** (Papadopoulos et al. 2009, Vlachos et al. 2012, Vlachos et al. 2015), μια αξιόπιστη διαδικτυακή εφαρμογή, όπου μέσω της πλατφόρμας της μπορείς να ενισχύσεις την ανάλυση των πιθανών γονιδίων-στόχων για ένα ή περισσότερα miRNAs στα βιολογικά μονοπάτια. Επιπλέον μπορεί να παρέχει την συνδυαστική επίδραση της συνέκφρασης miRNAs. Η νέα μορφή χρησιμοποιεί ιεραρχική κατανομή των miRNAs και των σηματοδοτικών μονοπατιών βασισμένα στα βαθμό της αλληλεπίδρασής τους. Οι χρήστες μπορούν να δημιουργήσουν έναν χάρτη με τις αλληλεπιδράσεις στα μονοπάτια των miRNAs. Επίσης παρέχει αναγνώριση παθολογικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) στις θέσεις πρόσδεσης των miRNAs, όπως και ότι ο χρήστης μπορεί να αναγνωρίσει όλα τα προβλεπόμενα ή πειραματικώς επιβεβαιωμένα miRNAs, τα οποία στοχεύουν σε συγκεκριμένα μονοπάτια. Το MiRSystem και το DIANA-miRPath χρησιμοποιούν την miR-Base v20 και v21 αντιστοίχως, και το DIANA-miRPath συμπεριλαμβάνει High Confidence miRNA ομάδες.

2.9 Αλληλεπίδραση miRNA και μεταγραφικών παραγόντων

Τα miRNAs και οι μεταγραφικοί παράγοντες (transcription factors, TF) είναι ζωτικής σημασίας στη ρύθμιση των γονιδίων. Πληθώρα ερευνών έχει δείξει ότι τα miRNAs μπορούν να συνεργάζονται με μεταγραφικούς παράγοντες για να ρυθμίσουν τα γονίδια-στόχους ή να εκτελέσουν στοχευμένες λειτουργίες έμμεσα (Martinez et al. 2009). Οι μεταγραφικοί παράγοντες μετέχουν στη γονιδιακή ρύθμιση δρώντας στο επίπεδο της μεταγραφής. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η έκφραση των miRNAs μπορεί να ενεργοποιηθεί ή να κατασταλεί από μεταγραφικούς παράγοντες, ωστόσο οι μελέτες της TF-miRNA ρύθμισης είναι σχετικά περιορισμένες. Πρόσφατα, μερικές βάσεις δεδομένων και βιοπληροφορικά εργαλεία έχουν αναπτυχθεί ώστε να γίνει κατανοητή αυτή η αλληλεπίδραση.

Η **TransmiR** είναι μία μη αυτόματη βάση δεδομένων που βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των μεταγραφικών παραγόντων με τα microRNAs σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Wang et al. 2010). Παρέχει περιορισμένο αριθμό πειραματικώς επιβεβαιωμένων TF-miRNA αλληλεπιδράσεων σε διάφορα είδη, όπως και

πληροφορίες για τη συμμετοχή αυτών σε διάφορες μορφές καρκίνου και miRNA-σχετιζόμενες ασθένειες.

Η **PuTmiR** βάση δεδομένων εστιάζει στους μεταγραφικούς παράγοντες που μπορούν να ρυθμίσουν miRNAs (Bandyopadhyay et al. 2010). Παρέχει συλλογή πιθανών μεταγραφικών παραγόντων για κάθε πιθανό miRNA, 10 kb ανοδικά και καθοδικά της περιοχής πρόσδεση (binding). Επίσης προσφέρει πλατφόρμα όπου επιτρέπει την αναζήτηση με βάσει συγκεκριμένη περιοχή για κάθε miRNA, ώστε ώστε να εξάγεται στο τέλος μια λίστα με πιθανούς μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι πιθανόν ρυθμίζουν αυτά τα miRNAs.

Η **CircuitsDB** είναι μια βάση δεδομένων ειδική να αναγνωρίζει και αναλύει μεικτά κυκλώματα ρύθμισης μεταγραφικών παραγόντων και miRNAs στο γονιδίωμα των ανθρώπων και ποντικών βασισμένη σε βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας (Friard et al. 2010). Ειδικότερα, η ιστοσελίδα εστιάζει στη μελέτη ενός συγκεκριμένου τύπου αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε μεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές αλληλεπιδράσεις: το **miRNA-TFFFL** (feed forward regulatory Loop), δηλαδή κυκλώματα στα οποία ο μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζει το miRNA και μαζί συνεργούν σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη. Επιπλέον, αυτό το εργαλείο εξετάζει τις λειτουργικές ιδιότητες και σχετικές διαταραχές στις προτεινόμενες αλληλεπιδράσεις με χρήση εξωτερικών πηγών.

Το **MIR@NT@N** είναι διαδικτυακή εφαρμογή βασισμένη σε μοντέλα μετα-ρυθμιστικών δικτύων που απεικονίζουν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους μεταγραφικούς παράγοντες, τα miRNAs και τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (LeBeche et al. 2011). Προβλέπει ρυθμιστικά δίκτυα και υπο-δίκτυα συμπεριλαμβάνοντας συντηρημένα μοτίβα, FBLs (feed-backloops) και FFLs. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτού του εργαλείου είναι η δυνατότητα πρόβλεψης έμμεσων μεταγραφικών παραγόντων και έμμεσων miRNA ρυθμίσεων πάνω στο γονιδίωμα. Το MIR@NT@N διευκολύνει την ανάλυση των γενωμικών δεδομένων και επιτρέπει τον εντοπισμό των σχετικών μοριακών αλληλεπιδράσεων και συνδυασμένων ρυθμιστικών μοτίβων (πχ FFLs).

Τέλος η **ChiPBase** (Yang et al. 2013) είναι η πλέον ενημερωμένη βάση δεδομένων η οποία εμπεριέχει δεδομένα από ChIP-Seq (chromatin immunoprecipitation with next generation DNAsequencing), προκειμένου να διευκολύνει τη συνολική παρατήρηση και ανακάλυψη των χαρτών αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων και ρυθμιστικών αλληλεπιδράσεων των miRNAs.

Αναλύοντας εκατομμύρια θέσεις σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων έχει εντοπίσει δεκάδες χιλιάδες από αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Το ChIPBase παρέχει συνολικές ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις των μεταγραφικών παραγόντων με τα miRNAs εντοπισμένες μέσα από υψηλή ανάλυσης ChIP-Seq δεδομένα.

3. Σύνδεση miRNAs και ασθενειών.

3.1 Η απορρύθμιση του miRNA στις ανθρώπινες ασθένειες

Η συμμετοχή του microRNAs σε διάφορες παθήσεις ενισχύεται και από δεδομένα που υποστηρίζουν ότι απορρύθμιση αυτών ενέχεται στην ανάπτυξη και εξέλιξη διαφόρων ασθενειών (Thum et al. 2008, Lorenzen et al. 2011, Rebane et al. 2014), συμπεριλαμβανομένων αρκετών τύπων καρκίνου (Calin et al. 2006). Ένας τρόπος για την μελέτη των ασθενειών στις οποίες ενέχεται η απορρύθμιση των miRNAs είναι ο συνδυασμός δεδομένων από ανεξάρτητες πηγές. Σε αυτό, μεγάλη βοήθεια παρέχουν οι βάσεις δεδομένων, οι οποίες περιέχουν ενημερωμένες πληροφορίες.

Η **miR2Disease** (Jiang et al. 2009) είναι μία μη αυτόματη βάση δεδομένων, η οποία προσφέρει συγκεντρωτική πληροφορία για την απορρύθμιση των miRNAs σε αρκετές ασθένειες στον άνθρωπο. Κάθε εγγραφή διαθέτει λεπτομέρειες του εκάστοτε miRNA με την σχετιζόμενη ασθένεια, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού αναγνώρισης (ID) του κάθε miRNA, το όνομα της ασθένειας, μία περιληπτική περιγραφή της σύνδεσης miRNA-ασθένειας, το μοντέλο της έκφρασης του miRNA στο στάδιο της ασθένειας, τη μέθοδο εντοπισμού της έκφρασης του miRNA, τα πειραματικά επιβεβαιωμένα γονίδια στόχοι των miRNAs και βιβλιογραφικές αναφορές. Η miR2Disease περιέχει επίσης μία σελίδα με προτεινόμενα για συσχέτιση νέων miRNAs με ασθένειες.

Η **MiRo** (Lagana et al. 2009), η οποία είναι μια διαδικτυακή βάση δεδομένων, παρέχει δεδομένα που υποδεικνύουν συσχέτιση των miRNAs με το φαινότυπο αρκετών παθήσεων στον άνθρωπο χρησιμοποιώντας δεδομένα από διάφορες διαδικτυακές πηγές, συμπεριλαμβανομένου βάσεις δεδομένων σχετικά με τα miRNAs, οντολογίες, ασθένειες και mRNA-στόχους, σε μία ενοποιημένη εφαρμογή. Η MiRo με αυτόν τον τρόπο επιτρέπει τη συσχέτιση γονιδίων και ασθενειών βασισμένα στις λειτουργίες και μελέτες των miRNAs.

Η **PhenomiR** (Ruepp et al. 2010) είναι μια βάση δεδομένων, η οποία παρέχει πληροφορίες για την παρουσία διαφορετικής ρύθμισης των miRNAs σε μια ασθένεια και σε διάφορες βιολογικές διεργασίες. Η **OncomiRDB** (Wang et al. 2014) είναι μία μη αυτόματη βάση δεδομένων στην οποία αναφέρονται πειραματικά επιβεβαιωμένα ογκογόνα και ογκοκατασταλτικά miRNAs. Περιέχει 2259 καταχωρήσεις για τη ρύθμιση ογκο-συσχετιζόμενων miRNAs, τα οποία προέρχονται απευθείας από πειραματικά ευρήματα μέσα από 9000 δημοσιεύσεις καλύπτοντας περισσότερα από 300 miRNAs και 829 γονίδια-στόχους σε 25 διαφορετικούς καρκινικούς ιστούς. Παρέχει γραφικό περιβάλλον για τον χρήστη, αλλά και κειμένου, διευκολύνοντας την υπολογιστική ανάλυση και πειραματική μελέτη του δικτύου της ρύθμισης των miRNAs και της λειτουργίας τους στο καρκίνο.

Η **miRCancer** (Xie et al. 2015) είναι μια άλλη βάση δεδομένων που περιλαμβάνει miRNAs τα οποία έχουν συσχετιστεί με τον καρκίν και η οποία συγκροτείται ύστερα από μελέτη της σχετικής βιβλιογραφίας. Περιέχει 878 συσχετίσεις ανάμεσα σε 236 miRNAs και 79 ανθρώπινων τύπων καρκίνου μέσα από 426000 δημοσιευμένες μελέτες. Τέλος, **HMDD** (Human micro RNA Disease Database) (Li et al. 2014) περιέχει πειραματικά δεδομένα miRNAs που έχουν συσχετιστεί με διάφορες παθήσεις στον άνθρωπο. Τα δεδομένα στα οποία βασίζεται αφορούν ένα σύνολο γενετικών και επιγενετικών παραγόντων, κυκλοφορούντων miRNAs και αλληλεπιδράσεων miRNA και γονιδίων στόχων.

Από όλες αυτές τις βάσεις δεδομένων η miR2Disease και η miRo δεν έχουν ενημερωθεί τα τελευταία 5 χρόνια και είναι συνδεδεμένες με μία παλιά έκδοση της miRBase. Η PhenomiR είναι νεότερη, αλλά επίσης συνδέεται με μια παλαιότερη έκδοση της miRBase (v12). Η OncomiRDB, η miRCancer και η HMDD χρησιμοποιεί την έκδοση της miRBase v20, v18, v20 αντίστοιχα. Η OncomiRDB και η miRCancer παρέχουν μόνο δεδομένα για τύπους καρκίνου, η HMDD παρέχει πληροφορίες για πολλές ανθρώπινες ασθένειες.

3.2 Εξωκυττάρια κυκλοφορούντα miRNAs

Τα miRNAs είναι δυνατόν να εντοπίζονται εξωκυτταρικά σε σωματικά υγρά, όπως ο ορός του αίματος, το σίελο, το πλάσμα και τα ούρα. Λόγω της παραπάνω ιδιότητάς τους, τα miRNAs μπορούν να ληφθούν ως πιθανοί βιοδείκτες, διότι είναι εύκολη η συλλογή τους. Επιπλέον η χρήση τους ως βιοδείκτες στηρίζεται και στο γεγονός ότι είναι σταθερά σε διαφορετικές αποθηκευτικές και πειραματικές συνθήκες

και εντοπίζονται μέσω ειδικών, ευαίσθητων και επαναλήψιμων μεθόδων (Guay et al. 2013). Μέχρι σήμερα μελέτες έχουν αναδείξει αρκετά miRNAs στα σωματικά υγρά στον άνθρωπο. Μερικά miRNAs της εξωκυτταρικής κυκλοφορίας έχουν πρόσφατα αναφερθεί ως συσχετιζόμενα με ασθένειες συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου (Russo et al. 2012) και ασθένειες σχετιζόμενες με τη γήρανση (Olivieri et al. 2013, Olivieri et al. 2014), το οποίο ενισχύει την υπόθεση ότι κυκλοφορούντα microRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες διευκολύνοντας την πρόγνωση και διάγνωση των παθήσεων.

Μία συγκεντρωτική βάση δεδομένων είναι η MiRandola (Russo et al. 2012) η οποία παρέχει μη αυτόματα ταξινόμηση των εξωκυττάρων miRNAs. Είναι συνδεδεμένη με την MiRo επιτρέποντας στους χρήστες να εξάγουν την πιθανή βιολογική δράση των εξωκυττάρων miRNAs και τη σύνδεσή τους με τους φαινοτύπους.

3.3 MiRNAs, περιβαλλοντικοί παράγοντες και φαινότυπος

Τα miRNAs ενέχονται σε ένα αριθμό βιολογικών διαδικασιών και ανθρώπινων ασθενειών. Πληθώρα μελετών αναφέρουν τη σύνδεση ανάμεσα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες και στις ανθρώπινες ασθένειες (Mills et al. 2008, Soto et al. 2010) . Σύμφωνα με νεότερες αναφορές, τα miRNAs αλληλεπιδρούν με διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η διατροφή, το άγχος, το κάπνισμα, η μόλυνση του αέρα, το αλκοόλ, τα φάρμακα, οι ιοί, η ακτινοβολία επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη λειτουργία και δράση των microRNAs (Chen et al. 2012). Βασισμένη στα παραπάνω ευρήματα, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα miRNAs και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν από κοινού στην εξέλιξη των διάφορων ασθενειών και επηρεάζουν τον φαινότυπο αυτών (Izzotti et al. 2014). Η υπολογιστική ανάλυση και τα μοντέλα της αλληλεπίδρασης των miRNAs με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες παρέχουν σημαντικά στοιχεία για τη δράση του μηχανισμού επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων στα microRNAs, βοηθώντας την καλύτερη κατανόηση του ρόλου τους και την αλληλεπίδρασή τους στις ανθρώπινες ασθένειες. Τέτοιες έρευνες είναι ακόμα σε περιορισμένο επίπεδο.

Η **miREnviroment** είναι η βάση δεδομένων που παρέχει μια ευρεία συλλογή από πειραματικά δεδομένα, τα οποία ενισχύουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ miRNAs, περιβαλλοντικών παραγόντων και φαινοτύπου (Yang et al. 2011). Περιλαμβάνει

περισσότερες από 3857 καταχωρήσεις, 1242 miRNAs, 394 περιβαλλοντικούς παράγοντες, 305 φαινοτύπους και 24 είδη από 557 δημοσιεύσεις.

3.4 Οι πολυμορφισμοί των miRNA στόχων που συσχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί ενέχονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη διαφόρων παθήσεων δεδομένου ότι μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση ενός γονιδίου ή και microRNAs συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στη γονιδιακή ρύθμιση. Όπως έχει προαναφερθεί, τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, μέσω μετα-μεταγραφικής καταστολής δρώντας στο 3'UTR άκρο του mRNA-στόχου. Η αποτελεσματικότητα της αλληλεπίδρασης miRNA και mRNA-στόχου επηρεάζεται από τη συμπληρωματικότητα στην αλληλουχία έναρξης (2-7 νουκλεοτίδιο) (Brennecke et al. 2005). Τα SNPs στην περιοχή αυτή του miRNA-στόχου μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα πρόσδεση του miRNA στο γονίδιο-στόχο είτε θετικά είτε αρνητικά, γεγονός το οποίο έχει αντίκτυπο και στον φαινότυπο της πάθησης (Ryan et al. 2010). Επίπλεον πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα SNPs στην 3'UTR περιοχή του mRNA-στόχου ενδέχεται να επηρεάζουν τη λειτουργία του miRNA (Mishra et al. 2007, Hu et al. 2011). Αρκετές αναφορές δείχνουν συσχέτιση ανάμεσα σε SNPs στην 3'UTR του mRNA-στόχου με πολυπαραγοντικές ασθένειες όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, νευροεκφυλιστικές διαταραχές, Parkinson, Tourette's σύνδρομο, άσθμα, περιοδοντίτιδα και πολλών μορφών καρκίνου (Bruno et al. 2012). Επίσης αρκετοί πολυμορφισμοί φαίνεται να επηρεάζουν τη διαδικασία της ωρίμανσης ενός microRNA γεγονός το οποίο μπορεί να ενέχεται τόσο στην παθολογία μίας νόσου όσο και στην προδιάθεση για ανάπτυξη αυτής (Brennecke et al. 2010). Παρόλο που μέχρι σήμερα έχει ταυτοποιηθεί ένας σημαντικός αριθμός SNPs που επηρεάζουν τόσο την έκφραση των γονιδίων όσο και τη λειτουργία ή βιογένεση ενός miRNA, ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο η ύπαρξη ενός πολυμορφισμού συμβάλλει σε μία πάθηση χρειάζεται περαιτέρω μελέτη. Σε αυτό συμβάλλουν τα εργαλεία της βιοληροφορικής τα οποία παρέχουν τις πρώτες ενδείξεις σχετικά με την πιθανή συσχέτιση ενός SNP με μία πάθηση.

Η **Patrocles** (Hiard et al. 2012) είναι είμαι βάση δεδομένων που συλλέγει πολυμορφισμούς στο 3'UTR άκρο των γονιδίων, οι οποίοι διαταράσσουν τη ρύθμιση των miRNA-εξαρτώμενων γονιδίων σε 7 είδη σπονδυλωτών. Επίσης παρέχει το

Patroclesfinder, το οποίο επιτρέπει στους χρήστες να εντοπίσουν συγκεκριμένους πολυμορφισμούς που μπορούν να επηρεάσουν τη ρύθμιση των miRNA-εξαρτώμενων γονιδίων σε συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχο.

Το **MicroSniPer** (Barenboim et al. 2010) είναι μία διαδικτυακή εφαρμογή που προβλέπει όχι μόνο την επίδραση των SNP στα πιθανά miRNA-μόρια στόχους στην 3'UTR περιοχή των γονιδίων, αλλά και σε RNA/DNAαλληλουχίες (όπως 5'UTR ή ORFs (open reading frames)). Ειδικότερα, μπορεί να προβλέψει εάν ένα SNP μέσα στην περιοχή του στόχου θα περιορίσει ή θα ενισχύσει μία θέση πρόσδεσης του miRNA. Αρκετά SNPs είναι συνδεδεμένα με πολυπαραγοντικές ασθένειες, τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί με μελέτες GWAS (genome-wide association studies) (Hirschhorn et al. 2005). Τα GWAS και τα eQTL (expression quantitative trait locus) είναι μέθοδοι για την ταυτοποίηση γενετικών ποικιλομορφισμών οι οποίοι επιδρούν στην ικανότητα ανάπτυξης ασθένειας και της γονιδιακής έκφρασης.

Το **Mirsnpscore** (Thomas et al. 2011) είναι ένα υπολογιστικό εργαλείο το οποίο αναγνωρίζει SNPs που συσχετίζονται με ασθένειες, εστιάζοντας σε SNPs που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω των miRNAs. Συγκεκριμένα, προβλέπει την επίδραση των SNPs σε θέση πρόσδεση των miRNAs του γονιδίου-στόχου και μπορεί να χαρτογραφήσει τα αλληλόμορφα των SNPs που σχετίζονται με τα miRNAs, τα οποία αναδεικνύονται από GWAS.

Η διαδικτυακή βάση **MirSNP** (Liu et al. 2012) συλλέγει SNPs στον άνθρωπο για να προβλέψει θέσεις πρόσδεσης των miRNAs σε συνδυασμό με δεδομένα από GWAS και QTL, ώστε να αναγνωρίσει πιθανά miRNA-SNPs, τα οποία σχετίζονται με ασθένειες. Η βάση **miRdSNP** (Bruno et al. 2012) είναι μία συγκεντρωτική βάση δεδομένων που αφορά SNPs που σχετίζονται με ασθένειες. Παρέχει ισχυρά εργαλεία για τη μελέτη της απόστασης τους από τη θέση πρόσδεσης του miRNA στη 3'UTR του γονιδίου-στόχου. Επίσης συμβάλλει στην διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών της γονιδιακής απορρύθμισης για ασθένειες σχετιζόμενες με SNPs σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

Τέλος, το **PolymiRTS** (Ziebarth et al. 2012, Bhattacharya et al. 2014) προσφέρει ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών. Είναι μια ενοποιημένη πλατφόρμα, σχεδιασμένη για την ανάλυση της λειτουργικής επίδρασης των γενετικών πολυμορφισμών στη περιοχή έναρξης του miRNA και των miRNA θέσεων στόχων. Παρέχει σύνδεση ανάμεσα σε SNPs των θέσεων-στόχων των miRNAs, cis-acting eQTLs και αποτελέσματα GWAS για ανθρώπινες ασθένειες. Επίσης ενσωματώνει

δεδομένα από CLASH (cross-linking, ligation and sequencing of hybrids), ώστε να παρέχει ολοκληρωμένες και ακριβείς miRNA-mRNA αλληλεπιδράσεις. Από αυτά τα εργαλεία το MicroSNiper και το PolymiRTS ενημερώνονται συχνά και χρησιμοποιούν την miRBase v19, v20 αντιστοίχως.

3.5 Μεταλλάξεις στα miRNAs και στις θέσεις-στόχους τους

Μερικές βάσεις δεδομένων παρέχουν δεδομένα για μελέτη της επίδρασης των σωματικών και φυλετικών μεταλλάξεων στη λειτουργία των miRNAs σε ασθένειες.

Το **SomaMir** (Bhattacharya et al. 2012) είναι μια βάση δεδομένων η οποία συνδέεται με την έκδοση v17 του miRBase, περιέχει σωματικές μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να παρεμποδίσουν ή να δημιουργήσουν θέσεις πρόσδεσης των miRNAs. Επιπλέον η βάση περιέχει δεδομένα σχετικά με σωματικές και φυλετικές μεταλλάξεις, των miRNAs και των γονιδίων-στόχων τους, τα οποία έχουν πειραματικά δείξει επίδραση στη λειτουργία του miRNA και σύνδεση με καρκίνο.

Το **miR2GO** (Bhattacharya et al. 2015) είναι ένας διαδικτυακός server που προσφέρει συγκριτική ανάλυση λειτουργίας miRNAs στον άνθρωπο. Παρέχει δύο προγράμματα το miRmut2GO, το οποίο εφαρμόζει μια μέθοδο για να εκτιμήσει τη λειτουργική επίδραση των σωματικών και γονιδιακών μεταλλάξεων στην περιοχή έναρξης του miRNA, και το δεύτερο πρόγραμμα το miRpair2GO, το οποίο συγκρίνει τις λειτουργίες δυο διαφορετικών miRNAs, βασισμένο στα λειτουργικά σχόλια αναφορικά των ομάδων των γονιδίων στόχων.

4. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η γνώση, η επιλογή και χρήση των κατάλληλων βιοπληροφορικών εργαλείων, ώστε να μελετηθούν 5 miRNAs (mir-33b-3p, mir-4284, mir-6737-3p, mir-6858-3p, mir-7110-5p) στο ρόλο που διαδραματίζουν στα χονδροκύτταρα και η πιθανή συσχέτιση τους με την παθογένεια της ΟΑ.

5. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Βιοπληροφορική ανάλυση

Κατά την παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με εργαλεία βιοπληροφορικής επεξεργασία δεδομένων που προήλθαν από μικροσυστοιχίες για την ανεύρεση miRNA με διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό υγείων ατόμων και ασθενών με ΟΑ. Η βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε είχε σκοπό την ανεύρεση των σηματοδοτικών μονοπατιών και των βιολογικών διεργασιών, στις οποίες ενέχονται τα miRNAs με διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό ατόμων με ΟΑ συγκριτικά με υγιή άτομα. Συγκεκριμένα, βιοπληροφορική ανάλυση βασίστηκε σε προηγούμενα αποτελέσματα της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής, του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Από τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών επιλέχθηκαν τα 5 κορυφαία miRNAs με μειωμένη έκφραση στον ορό ασθενών με ΟΑ συγκριτικά με υγιή άτομα προκειμένου να βρεθούν τα γονίδια-στόχοι τους. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με την χρήση του αλγορίθμου πρόβλεψης στόχων των miRNAs, TargetScan 7.2 (http://www.targetscan.org/vert_72/).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση με την βάση δεδομένων PANTHER Gene ontology (<http://www.pantherdb.org/>) προκειμένου να συσχετιστούν τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχοι των υπό μελέτη miRNAs με συγκεκριμένες μοριακές, κυτταρικές και βιολογικές λειτουργίες καθώς και να ανευρεθούν τα σηματοδοτικά τους μονοπάτια. Στο επόμενο στάδιο, τα γονίδια-στόχοι των 5 miRNAs με μειωμένη έκφραση στον ορό ατόμων με ΟΑ αναλύθηκαν περαιτέρω για να αναδειχθούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται με την βοήθεια της βάσης δεδομένων DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) και με τη χρήση των KEGG μονοπατιών.

Για την εύρεση των προβλεπόμενων κοινών γονιδίων-στόχων και των κοινών σηματοδοτικών μονοπατιών ανάμεσα στα 5 miRNAs, δημιουργήθηκαν τα Venn διαγράμματα με τη βοήθεια του Venn Diagram Calculator (Bioinformatics, Evolutionary Genomics Group of the University of Gent).

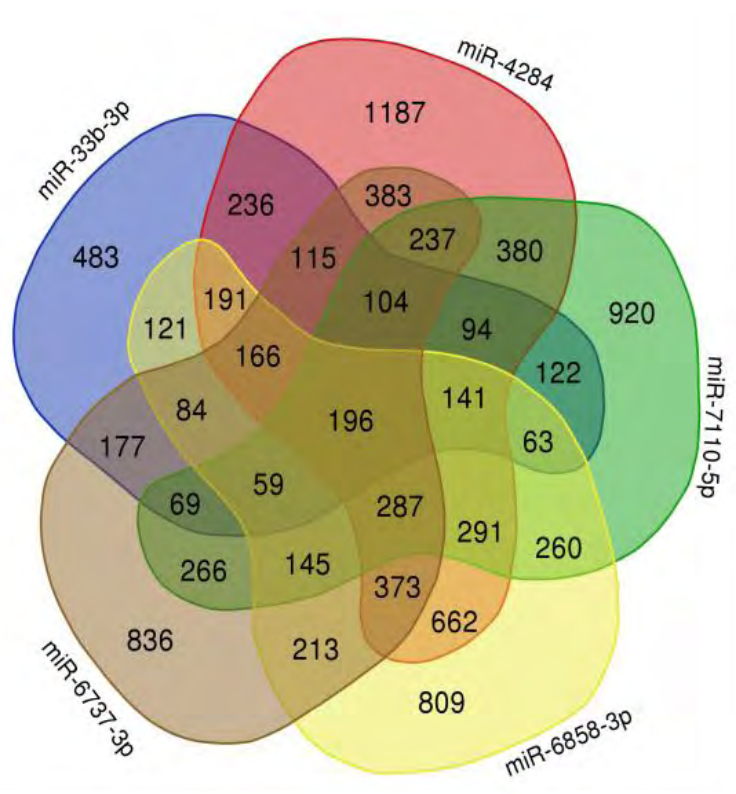
5.2 Αποτελέσματα

5.2.1 Επιλογή των miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p.

Για την παρούσα μελέτη, βασιστήκαμε σε προηγούμενα αποτελέσματα της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής, του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αφορούσαν την έκφραση miRNAs η οποία διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Agilent 8 × 60 K miRNA-array. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών 279 miRNAs είχαν διαφοροποιημένη έκφραση (205 και 74 miRNAs με αυξημένη και μειωμένη έκφραση αντιστοίχως) (FDR <0.008, $p < 0.05$) στον ορό ασθενών με ΟΑ σε σύγκριση με υγιή άτομα. Από τα παραπάνω microRNAs επιλέχθηκαν τα 5 κορυφαία miRNAs που παρουσίαζαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης στον ορό των ασθενών προκειμένου να αναλυθούν περαιτέρω με εργαλεία βιοπληροφορικής και να ανευρεθεί η βιολογική τους σημασία.

5.2.2 Εύρεση των προβλεπόμενων γονιδίων-στόχων των miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p.

Για την ανεύρεση των γονιδίων στόχων των miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος πρόβλεψης TargetScan και πραγματοποιήθηκε υπολογιστική πρόβλεψη όλων των πιθανών στόχων των επιλεγμένων microRNAs. Στην συνέχεια βρέθηκαν τα κοινά γονίδια-στόχοι για τα 5 miRNAs και απεικονίστηκαν ως Venn διαγράμματα με τη χρήση του εργαλείου Venn Diagram Calculator. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 4, 196 γονίδια είναι προβλεπόμενοι στόχοι και για 5 miR.

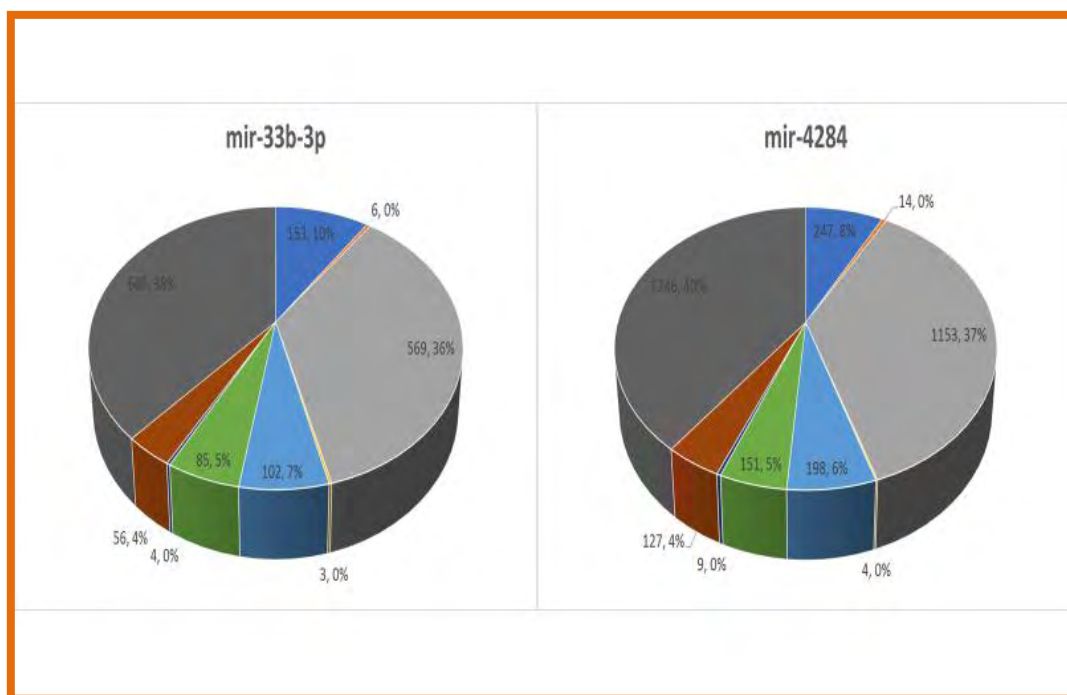


Εικόνα 4. Venn διάγραμμα που απεικονίζει τα κοινά προβλεπόμενα γονίδια-στόχοι των miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p.

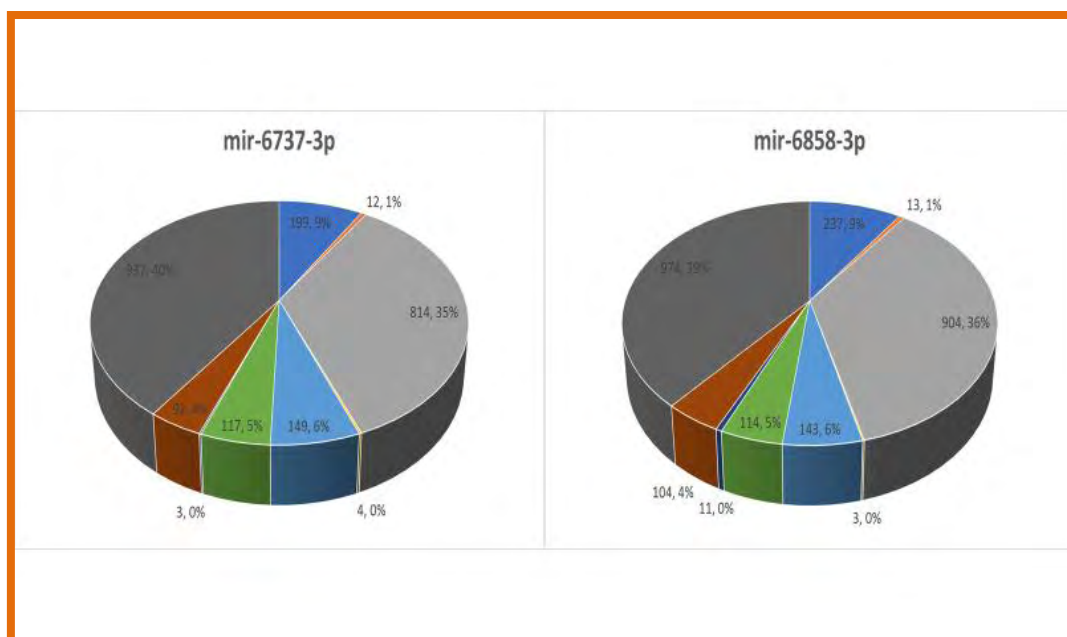
5.2.3 Ανάλυση των μοριακών, κυτταρικών και βιολογικών λειτουργιών των προβλεπόμενων γονιδίων στόχων των miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p.

A) Μοριακές λειτουργίες

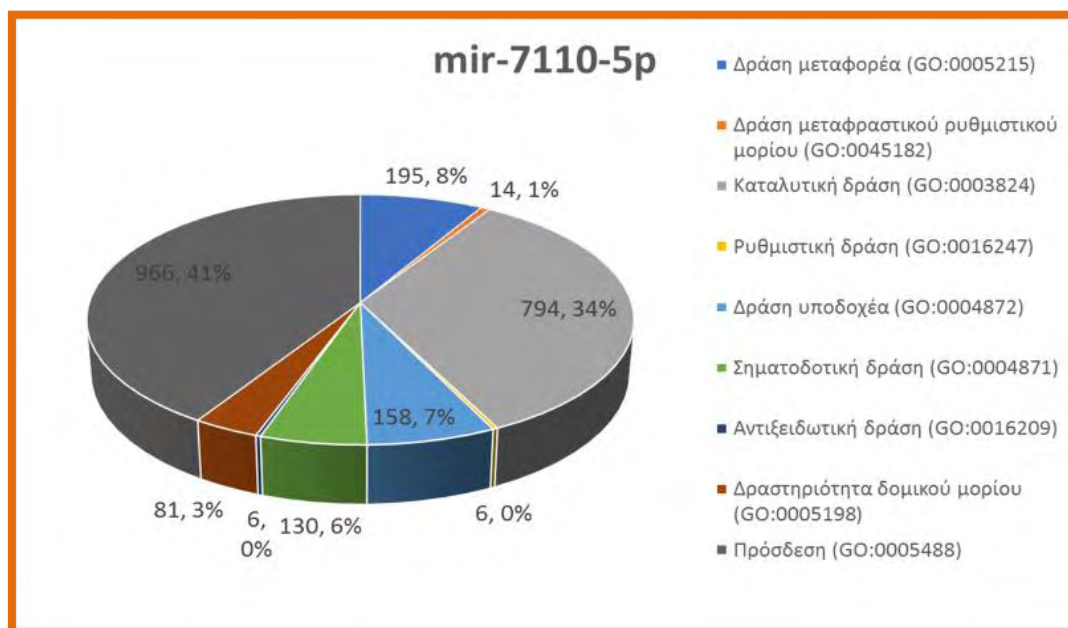
Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για να ανευρεθούν οι μοριακές λειτουργίες των γονιδίων-στόχων των 5 επιλεγμένων miRNAs έδειξε ότι η πλειοψηφία των γονιδίων-στόχων τους δρουν ως είτε ως μόρια πρόσδεσης είτε ως μόρια με καταλυτική δράση. Σε μικρότερο ποσοστό βρέθηκαν μόρια με δράση υποδοχέα, ρυθμιστική δράση σε κανάλια, δράση δομικών μορίων, μεταγωγείς σήματος και ρυθμιστές της μετάφρασης (Εικόνα 5-7)



Εικόνα 5. Απεικόνιση των μοριακών λειτουργιών των miR-33b-3p, miR-4284 σε μορφή πίτας (www.pantherdb.org).



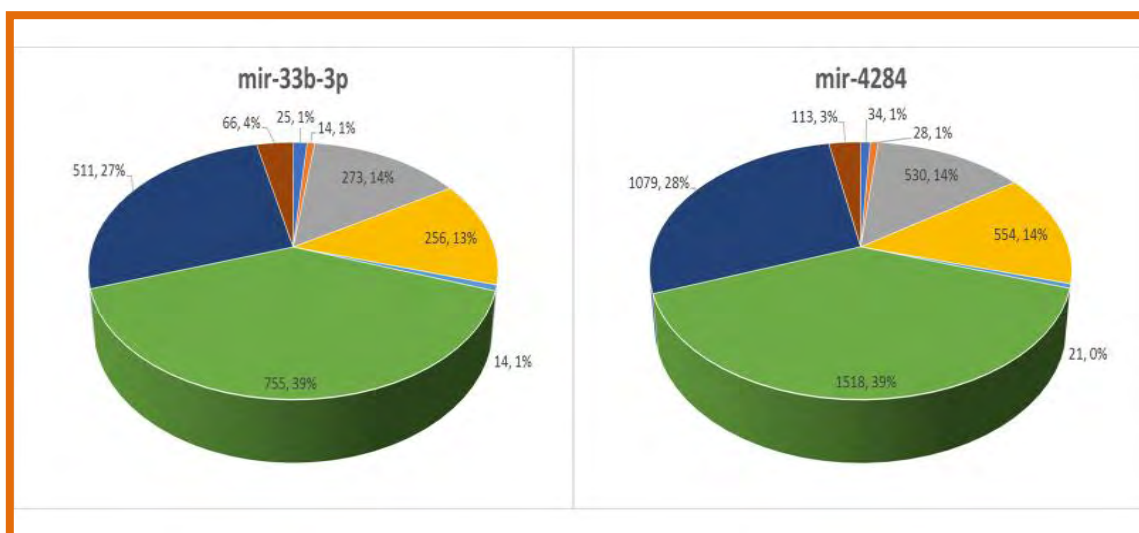
Εικόνα 6. Απεικόνιση των μοριακών λειτουργιών των miR-6737-3p, miR-6858-3p σε μορφή πίτας (www.pantherdb.org).



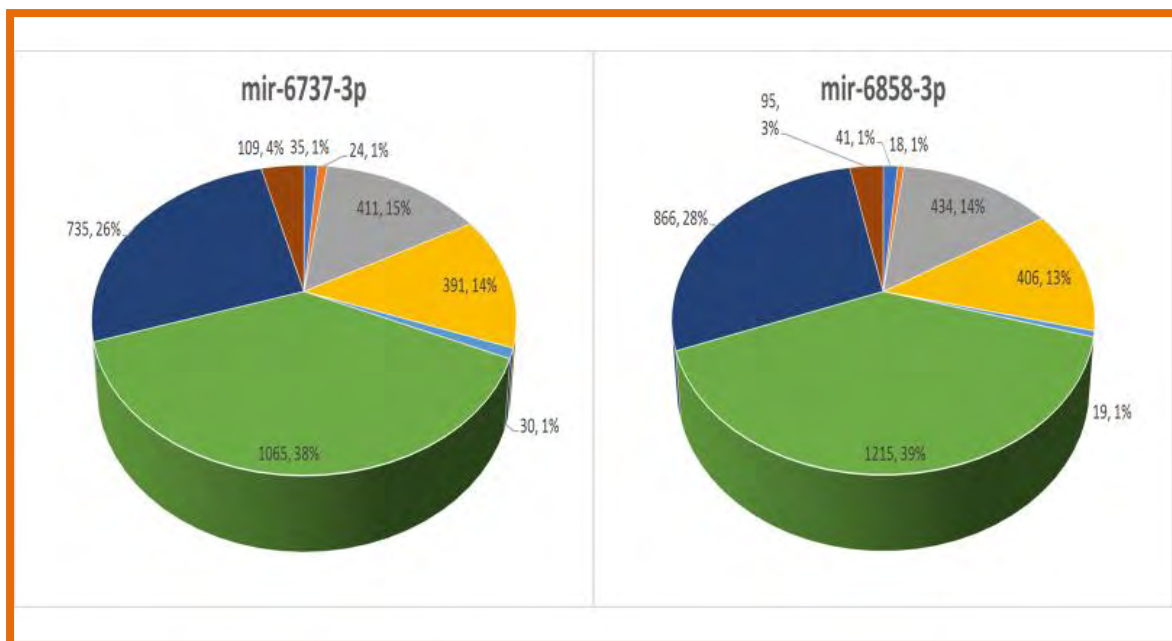
Εικόνα 7. Απεικόνιση των μοριακών λειτουργιών του miR-7110-5p σε μορφή πίτας και υπόμνημα. (www.pantherdb.org).

Β) Κυτταρικές λειτουργίες

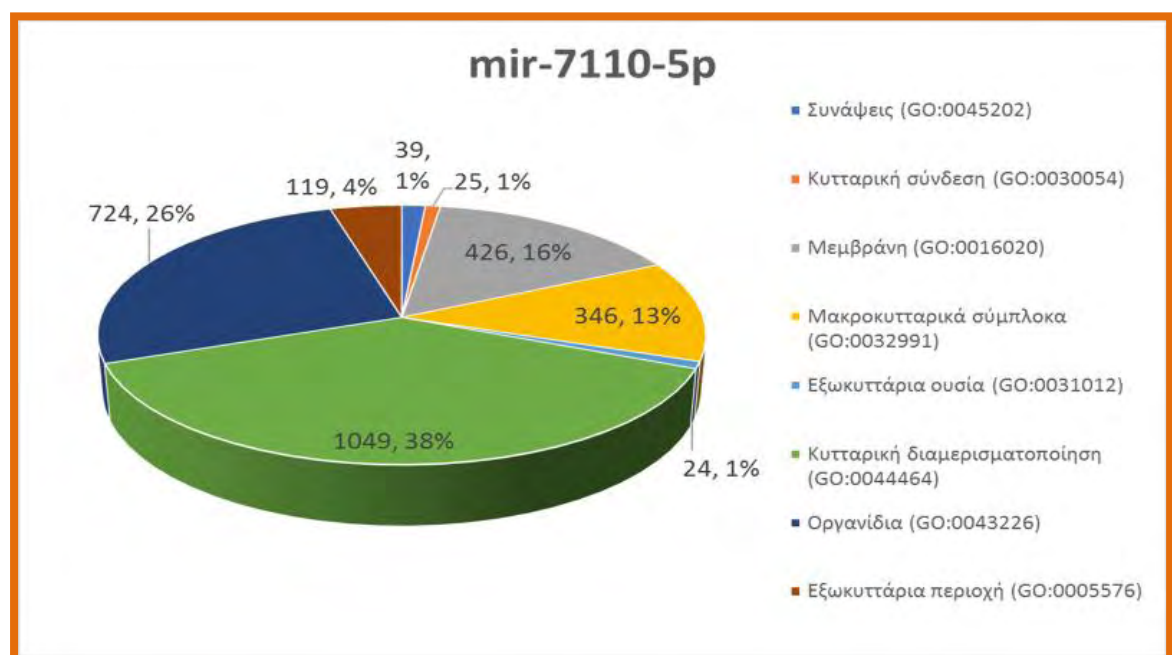
Όσον αφορά τις κυτταρικές λειτουργίες των γονιδίων-στόχων των επιλεγμένων miRNAσ, στην πλειοψηφία τους αποτελούν κυτταρικά τμήματα ή τμήματα από κυτταρικά οργανίδια. Σε μικρότερο ποσοστό βρίσκονται γονίδια που αποτελούν μέρος μακρομοριακών συμπλόκων, συστατικών της μεμβράνης και συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. (Εικόνα 8-10)



Εικόνα 8. Απεικόνιση των κυτταρικών λειτουργιών των miR-33b-3p, miR-4284 σε μορφή πίτας. (www.pantherdb.org).



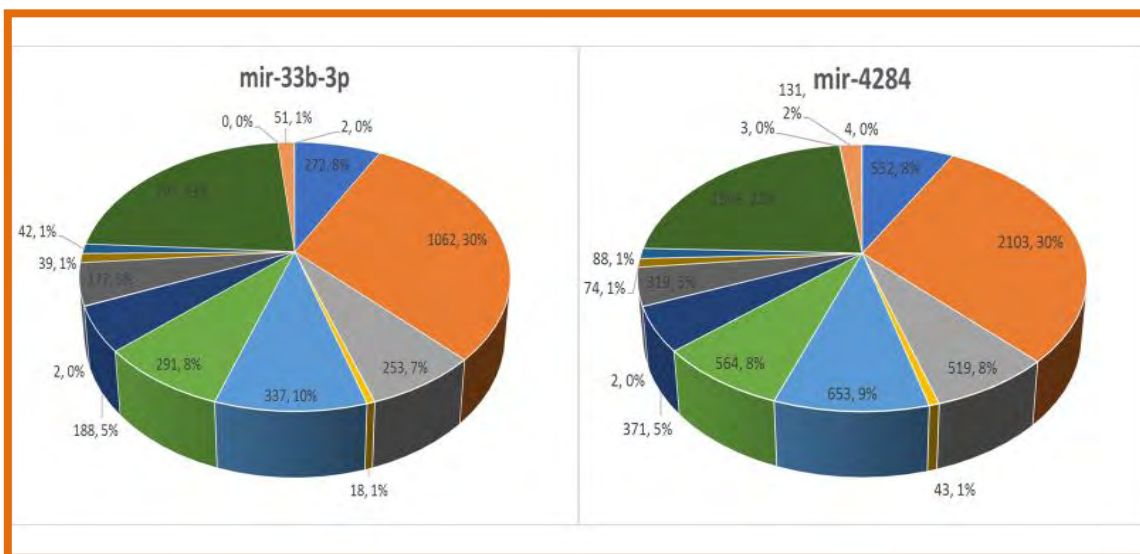
Εικόνα 9. Απεικόνιση των κυτταρικών λειτουργιών των miR-6737-3p, miR-6858-3p σε μορφή πίτας. (www.pantherdb.org)



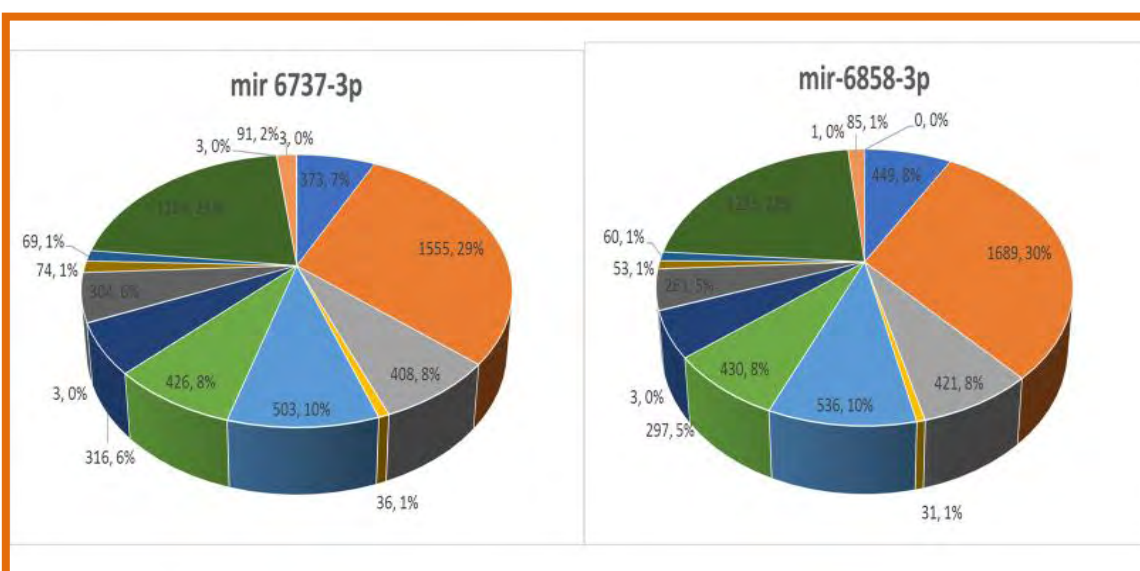
Εικόνα 10. Απεικόνιση των κυτταρικών λειτουργιών του miR-7110-5p σε μορφή πίτας και υπόμνημα. (www.pantherdb.org).

Γ) Βιολογικές διεργασίες

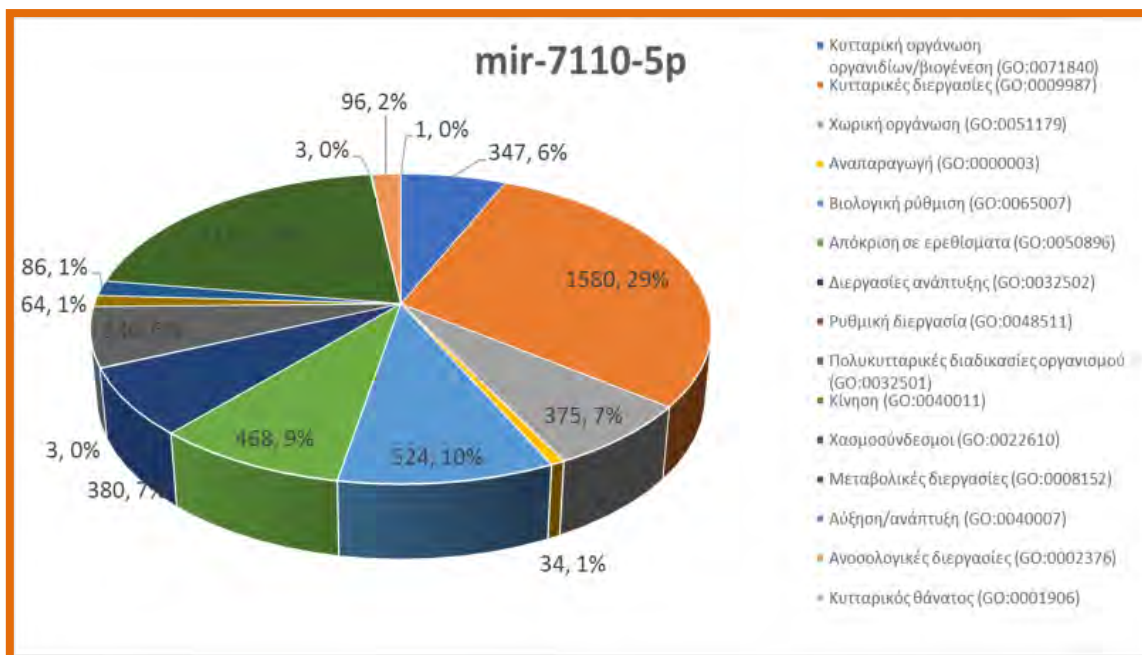
Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τις βιολογικές λειτουργίες στις οποίες ενέχονται τα miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των γονιδίων-στόχων τους ενέχονται σε κυτταρικές και μεταβολικές διεργασίες, ενώ σε μικρότερο ποσοστό εμφανίζονται γονίδια που μετέχουν σε κυτταρικό θάνατο και στη ρύθμιση των βιολογικών διαδικασιών (Εικόνα 11-13).



Εικόνα 11. Απεικόνιση των βιολογικών διεργασιών των miR-33b-3p, miR-4284 σε μορφή πίτας. (www.pantherdb.org).



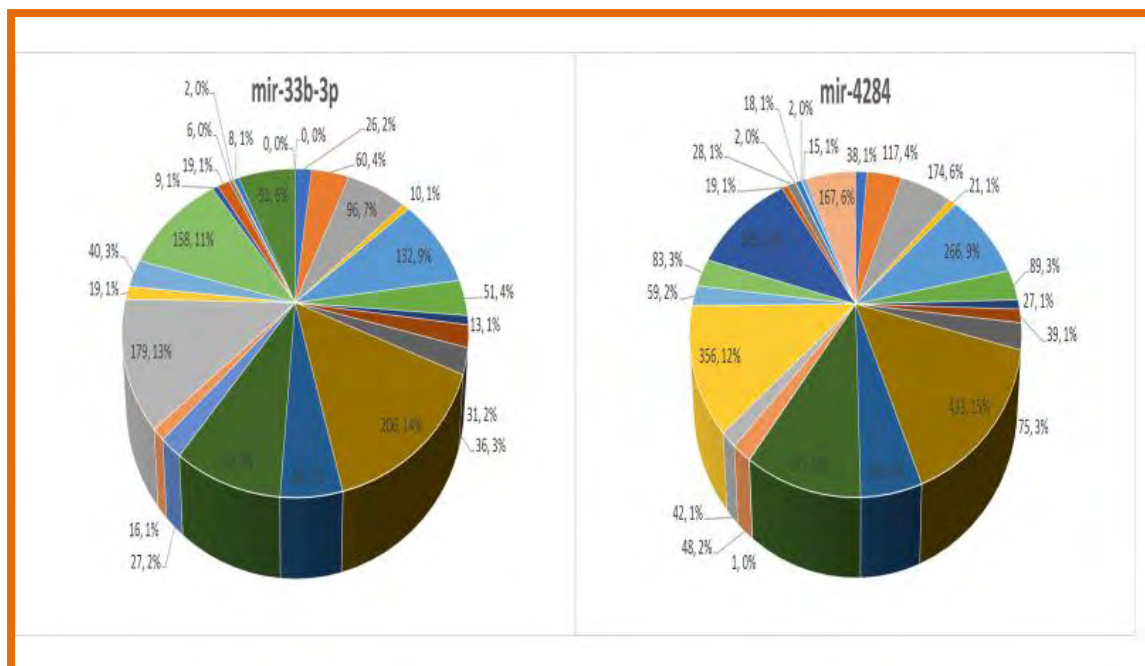
Εικόνα 12. Απεικόνιση των βιολογικών διεργασιών των miR-6737-3p, miR-6858-3p σε μορφή πίτας. (www.pantherdb.org).



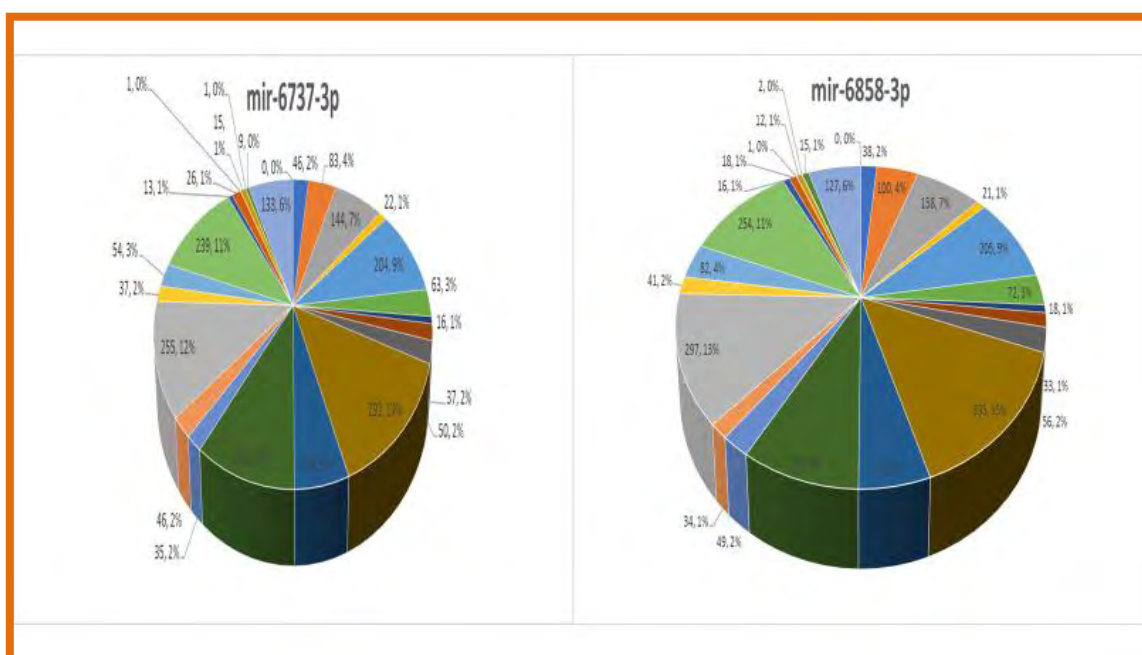
Εικόνα 13. Απεικόνιση των βιολογικών διεργασιών του miR-7110-5p σε μορφή πίτας και υπόμνημα. (www.pantherdb.org).

Δ) Ταξινόμηση πρωτεϊνών

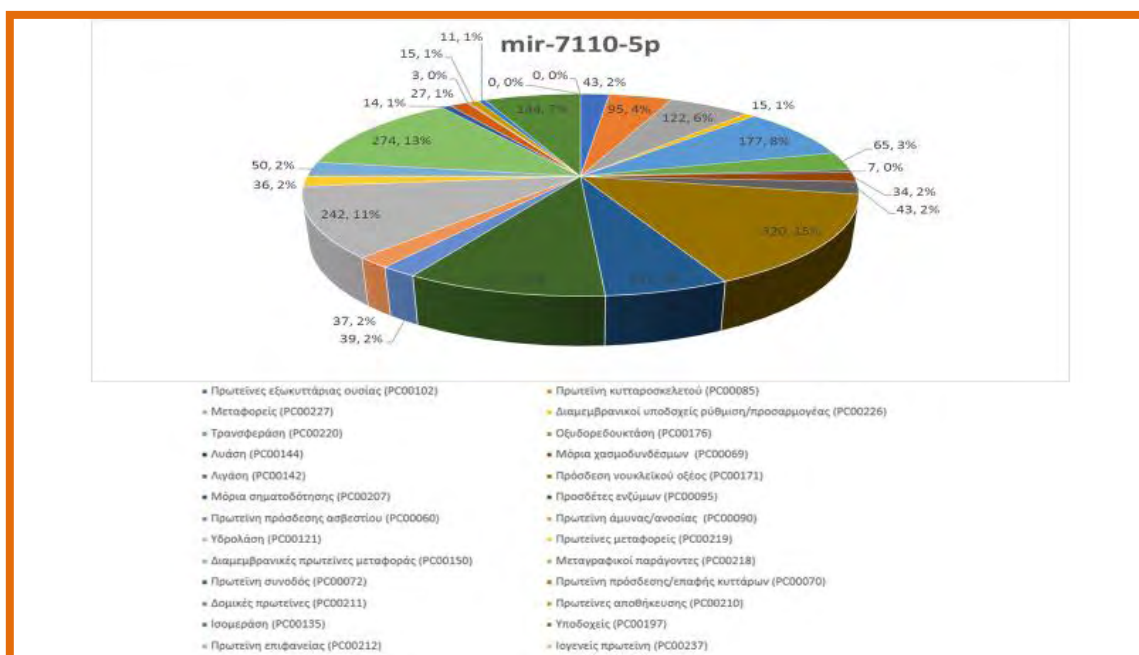
Η ανάλυση με τη βάση δεδομένων panther για την πρωτεϊνική κατανομή των γονιδίων-στόχων των miR (mir-33b-3p, mir-4284, mir-6858-39, mir-6737-3p, mir-7110-5p) έδειξε ότι κυρίως αποτελούνται από μόρια σηματοδότησης και πρόσδεσης νουκλεικών οξέων, πρωτεΐνες κυτταροσκελετού και μεταφορείς. Ενώ σε μικρότερο ποσοστό απαντώνται διαμεμβρανικοί υποδοχείς, δομικές πρωτεΐνες και μεταγραφικοί παράγοντες (Εικόνα 14-16).



Εικόνα 14. Απεικόνιση ταξινόμησης πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τα miR-33b-3p, miR-4284 σε μορφή πίτας. (www.pantherdb.org).



Εικόνα 15. Απεικόνιση ταξινόμησης πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τα miR-6737-3p, miR-6858-3p σε μορφή πίτας. (www.pantherdb.org).

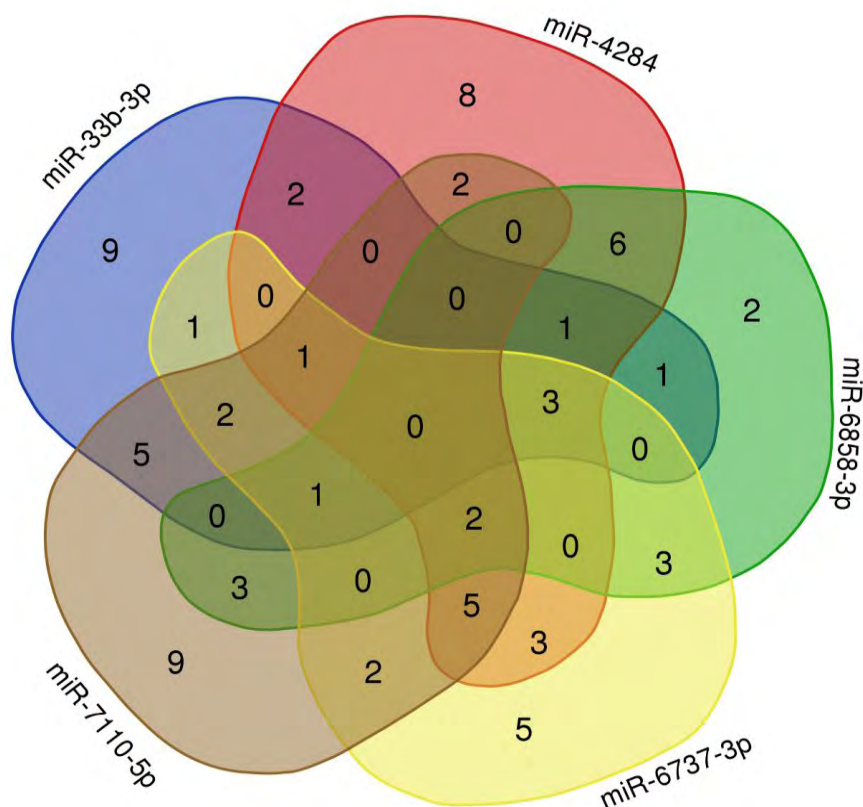


Εικόνα 16. Απεικόνιση ταξινόμησης πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τα miR-7110-5p σε μορφή πίτας και υπόμνημα. (www.pantherdb.org).

5.2.4 Ανάλυση μονοπατιών κατά KEGG με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής DAVID

Επιπλέον, δεδομένου ότι τα miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p και miR-6737-3p παρουσίασαν κοινό μοτίβο έκφρασης σύμφωνα με τα δεδομένα των microarrays (υποεκφράζονται στον ορό ατόμων με ΟΑ σε σχέση με φυσιολογικά άτομα) προχωρήσαμε σε ανάλυση μονοπατιών και με το διαδικτυακό εργαλείο DAVID και στη συνέχεια κατασκευάσαμε Venn διάγραμμα. Το Venn διάγραμμα (Εικόνα 17) έδειξε ότι υπάρχουν αρκετά μονοπάτια, τα οποία έχουν συσχετιστεί με την παθογένεια της ΟΑ, που ρυθμίζονται από κοινού από τα επιλεγμένα miRNA. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι τα miR-4284, miR-6737-3p, miR-6858-3p, και το miR-7110-5p φαίνεται ότι ρυθμίζουν από κοινού το σηματοδοτικό μονοπάτι της Ινσουλίνης, ενώ τα miR-4284, miR-6737-3p και miR-7110-5p το mTOR σηματοδοτικό μονοπάτι. Τα miR-33b-3p και miR-4284 ρυθμίζουν από κοινού το μονοπάτι Toll-like receptor, ενώ miR-6858-3p και miR-7110-5p το σηματοδοτικό μονοπάτι του Wnt. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα μονοπάτια του μεταβολισμού και βιοσύνθεσης των λιπιδίων που φαίνεται να ρυθμίζονται από τα επιλεγμένα microRNAs, δεδομένης της μεταβολικής συνιστώσας στην παθογένεια της ΟΑ. Συγκεκριμένα, το miR-33b-3p και το miR-7110-5p φαίνεται να ενέχονται στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό των γλυκεροφωσfolιπιδίων, τα miR-4284 και miR-7110-5p στο

μεταβολισμό των γλυκοσφιγγολιπιδίων, τα miR-6737-3p και miR-6858-3p στο σηματοδοτικό μονοπάτι των αντιποκινών και στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Ενώ το miR-33b-3p φαίνεται να ενέχεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού των γλυκερολιπιδίων, των ABC-μεταφορέων, των αιθερολιπιδίων, αλλά και στη ρύθμιση της αυτοφαγίας (πίνακας 1).



Εικόνα 17. Venn διάγραμμα που απεικονίζει τα κοινά προβλεπόμενα μονοπάτια που ενέχονται ταγονίδια-στόχοι των miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p.

Πίνακας 1. Κοινά μονοπάτια των miRNAs.

Names	Total	Elements
miR-33b-3p miR-6737-3p miR-6858-3p miR-7110-5p	1	hsa04720:Long-term potentiation
miR-4284 miR-6737-3p miR-6858-3p miR-7110-5p	2	hsa04910:Insulin signaling pathway
		hsa04144:Endocytosis
miR-33b-3p miR-4284 miR-6858-3p	1	hsa00670:One carbon pool by folate

miR-33b-3p miR-6737-3p miR-7110-5p	2	hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)
		hsa04360:Axon guidance
miR-4284 miR-6737-3p miR-7110-5p	5	hsa04660:T cell receptor signaling pathway
		hsa04012:ErbB signaling pathway
		hsa05221:Acute myeloid leukemia
		hsa05215:Prostate cancer
		hsa04150:mTOR signaling pathway
miR-33b-3p miR-4284	2	hsa04620:Toll-like receptor signaling pathway
		hsa03020:RNA polymerase
miR-33b-3p miR-6858-3p	1	hsa04130:SNARE interactions in vesicular transport
miR-33b-3p miR-6737-3p	1	hsa04960:Aldosterone-regulated sodium reabsorption
miR-33b-3p miR-7110-5p	5	hsa04270:Vascular smooth muscle contraction
		hsa04912:GnRH signaling pathway
		hsa04730:Long-term depression
		hsa00564:Glycerophospholipid metabolism
		hsa04010:MAPK signaling pathway
miR-4284 miR-6858-3p	6	hsa04115:p53 signaling pathway
		hsa00240:Pyrimidine metabolism
		hsa05222:Small cell lung cancer
		hsa05214:Glioma
		hsa03010:Ribosome
		hsa00230:Purine metabolism
miR-4284 miR-6737-3p	3	hsa04142:Lysosome
		hsa05213:Endometrial cancer
		hsa05211:Renal cell carcinoma

miR-4284 miR-7110-5p	2	hsa05210:Colorectal cancer
		hsa00603:Glycosphingolipid biosynthesis
miR-6737-3p miR-6858-3p	3	hsa04920:Adipocytokine signaling pathway
		hsa00061:Fatty acid biosynthesis
		hsa00534:Heparan sulfate biosynthesis
miR-6858-3p miR-7110-5p	3	hsa05014:Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)
		hsa04370:VEGF signaling pathway
		hsa04310:Wnt signaling pathway
miR-6737-3p miR-7110-5p	2	hsa04722:Neurotrophin signaling pathway
		hsa04914:Progesterone-mediated oocyte maturation
miR-33b-3p	9	hsa04623:Cytosolic DNA-sensing pathway
		hsa04810:Regulation of actin cytoskeleton
		hsa04622:RIG-I-like receptor signaling pathway
		hsa00680:Methane metabolism
		hsa00561:Glycerolipid metabolism
		hsa02010:ABC transporters
		hsa04540:Gap junction
		hsa00565:Ether lipid metabolism
		hsa04140:Regulation of autophagy
miR-4284	8	hsa04210:Apoptosis
		hsa00270:Cysteine and methionine metabolism
		hsa01040:Biosynthesis of unsaturated fatty acids
		hsa03440:Homologous recombination
		hsa04940:Type I diabetes mellitus
		hsa04062:Chemokine signaling pathway
		hsa04350:TGF-beta signaling pathway
		hsa00250:Alanine, aspartate and glutamate metabolism
miR-6858-3p	2	hsa04662:B cell receptor signaling pathway
		hsa00910:Nitrogen metabolism
miR-6737-3p	5	hsa00532:Chondroitin sulfate biosynthesis
		hsa04120:Ubiquitin mediated proteolysis
		hsa00562:Inositol phosphate metabolism
		hsa04070:Phosphatidylinositol signaling system
		hsa04520:Adherens junction
miR-7110-5p	9	hsa04320:Dorso-ventral axis formation
		hsa04666:Fc gamma R-mediated phagocytosis

		hsa04340:Hedgehog signaling pathway
		hsa04664:Fc epsilon RI signaling pathway
		hsa05217:Basal cell carcinoma
		hsa04916:Melanogenesis
		hsa00592:alpha-Linolenic acid metabolism
		hsa04020:Calcium signaling pathway
		hsa05216:Thyroid cancer

6. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ανάγκη για την περαιτέρω διερεύνηση της συμμετοχής των miRNAs στη ρύθμιση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στην παθογένεια της Οστεοαρθρίτιδας (ΟΑ) και της πιθανής χρήσης αυτών ως βιοδείκτες. Στη παρούσα διπλωματική εργασία, διερευνήσαμε τον πιθανό βιολογικό ρόλο, 5 διαφοροποιημένων miRNAs στον ορό ασθενών με ΟΑ σε σχέση με φυσιολογικά άτομα, με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής.

Για τη διερεύνηση πιθανών διαγνωστικών miRNAs στην ΟΑ, χρησιμοποιήσαμε δεδομένα μικροσυστοιχιών σύμφωνα με προηγούμενα αποτελέσματα της ερευνητικής ομάδας από το Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε ορό από άτομα με ΟΑ συγκριτικά με υγιή. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα 5 miRNAs (miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p) με μειωμένη έκφραση στον ορό ατόμων με ΟΑ, προκειμένου να αναλυθεί περαιτέρω ο βιολογικός του ρόλος με εργαλεία βιοπληροφορικής.

Αρχικά, έγινε επιλογή του κατάλληλου εργαλείου για την πρόβλεψη των γονιδίων στόχων του κάθε miRNA ξεχωριστά. Τα miRNAs φέρουν χαρακτηριστικά όπως η αλληλουχία, η δομή και διακριτά τμήματα, όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος, τα οποία θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν από τον αλγόριθμο του υπολογιστικού εργαλείου που θα επιλεγεί. Στο συγκεκριμένο βήμα, επελέγησαν τα TargetScan, Diana-microT και το miRanda. Τα εργαλεία αυτά έχουν διαφορετική βαρύτητα όσον αφορά στο τρόπο με το οποίο θα αναλύσουν το ίδιο miRNA, προκειμένου να γίνει η εύρεση των γονιδίων στόχων του.

Το TargetScan επιλέχθηκε διότι είναι υπολογιστικά ισχυρό και εμπεριέχει ολοκληρωμένη αναζήτηση μεταξύ των ισομορών (στη περίπτωση που υπάρχουν), είναι πιο αυστηρό, με τις λιγότερο συντηρημένες αλληλεπιδράσεις και η βάση δεδομένων του είναι η πλέον ενημερωμένη (Ángela L. Riffo-Campos et al. 2016).

Μετά την εξαγωγή των γονιδίων στόχων από το TargetScan ακολούθησε η επεξεργασία αυτών, ώστε να ανευρεθεί σε ποια σηματοδοτικά μονοπάτια συμμετέχουν τα ανευρεθέντα γονίδια. Αυτό πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό εργαλείο DAVID. Το DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) έκδοση v6.8 είναι το πλέον ισχυρό, ολοκληρωμένο και σύγχρονο εργαλείο, ικανό να διαχειριστεί/επεξεργαστεί ταυτόχρονα πολλές λίστες γονιδίων.

Η ανάλυση με το DAVID, έδειξε ότι τα γονίδια-στόχοι προβλέπεται να ενέχονται σε μονοπάτια που σχετίζονται με την παθογένεια της ΟΑ, όπως μεταβολικά μονοπάτια (μεταβολισμός, γλυκερολιπιδίων, γλυκεροφωσφολιπιδίων και γλυκοσφιγγολιπιδίων, βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, σηματοδοτικό μονοπάτι αντιποκινών, σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης), σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, mTOR και σηματοδοτικό μονοπάτι Toll-like υποδοχέα.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση με την βάση δεδομένων PANTHER Gene ontology (<http://www.pantherdb.org/>), προκειμένου να συσχετιστούν τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχοι των υπό μελέτη miRNAs με συγκεκριμένες μοριακές, κυτταρικές και βιολογικές λειτουργίες. Ως προς τις μοριακές λειτουργίες φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο/δράση, στη πρόσδεση, δράση κατάλυσης, δράση μεταφορέα, υποδοχέα, σηματοδότησης, δραστηριότητα δομικού μορίου, μεταφραστικού ρυθμιστικού μορίου και αντιοξειδωτική. Ως προς τις κυτταρικές λειτουργίες, τα γονίδια στόχοι των 5 miRNAs ενέχονται στη κυτταρική διαμερισματοποίηση, στα οργανίδια, στη μεμβράνη, στα μακρομοριακά σύμπλοκα, στην εξωκυττάρια περιοχή, στις συνάψεις, στη κυτταρική σύνδεση και στην εξωκυττάρια ουσία. Ως προς τις βιολογικές διεργασίες, φαίνεται να δρουν στις κυτταρικές διεργασίες, στις μεταβολικές διεργασίες, στην ανάπτυξη, στην απόκριση σε ερεθίσματα, στη βιολογική ρύθμιση, στη βιογένεση, στις ανοσολογικές διεργασίες, στην αναπαραγωγή, στη κίνηση, στον κυτταρικό ρυθμό και στον κυτταρικό θάνατο.

Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι το miR-33b-3p έχει μελετηθεί στο πλαίσιο της ΟΑ (Ntoumou et al. 2017), όπου εμφανίζεται με μειωμένα επίπεδα έκφρασης στον ορο ασθενών με ΟΑ, στην οποία μελέτη παρουσιάζει από κοινού με τα miR-140-3p, miR-671-3p πιθανότητα να αποτελεί βιοδείκτης για την ΟΑ, λόγω του ρόλου του στις μεταβολικές διαδικασίες των χονδροκυττάρων (Ntoumou et al. 2017).

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα 4 miRNAs miR-4284, miR-6737-3p, miR-6858-3p και miR-7110-5p γαι τα οποία δεν υπάρχουν μελέτες στο πλαίσιο της ΟΑ. Ωστόσο υπάρχουν μελέτες για τα miR-4284 και miR-7110-5p, όπου εμφανίζεται το miR-4284 να μετέχει στο γαστρικό καρκίνο (Li Y. et al. 2018), στη νόσο του Crohn (Palmieri O. et al. 2017), και να είναι πιθανός βιοδείκτης στο διάχυτο μεγάλο Β-κυτταρικό λέμφωμα (Tamaddon G. et al. 2016), και το miR-7110-5p σε εν δυνάμει σχέση στους μοριακούς μηχανισμούς των CD133(+)A549 κυττάρων, εμπεριέχοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR και το Wnt (Chen QY et al. 2016).

Συμπερασματικά, όλες οι *in silico* προβλέψεις της παρούσας μελέτη υπογραμμίζουν τον βιολογικό ρόλο των miR-33b-3p, miR-4284, miR-7110, miR-6858-3p, miR-6737-3p στην ομοιόσταση του κυττάρου και τη πιθανή συμμετοχή τους σε μεταβολικά μονοπάτια και σε μονοπάτια φλεγμονής, τα οποία συμβάλλουν στην παθογένεια της ΟΑ, αναδεικνύοντας τα ως μόρια που θα μπορούσαν εαν επιβεβαιωθούν με λειτουργικές μελέτες να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες στον ορό για τη διάγνωση της ΟΑ. Ωστόσο, χρειάζονται αρκετές μελέτες για την πειραματική επαλήθευση της ανίχνευσης των εν λόγω miRNAs στον ορό και στους ιστούς της άρθρωσης ατόμων με ΟΑ και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του βιολογικού τους ρόλου με πειραματικά δεδομένα.

7. Βιβλιογραφία:

- Agarwal,S., Vaz,C., Bhattacharya,A. and Srinivasan,A. (2010) Prediction of novel precursor miRNAs using a context-sensitive hidden Markov model (CSHMM). *BMC Bioinform.*, 11, S29.
- Agarwal,V., Bell,G.W., Nam,J.-W. and Bartel,D.P. (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*, 4, e05005.
- Alexiou,P., Maragkakis,M., Papadopoulos,G.L., Simmosis,V.A., Zhang,L. and Hatzigeorgiou,A.G. (2010) The DIANA-mirExTra web server: from gene expression data to microRNA function. *PloS One*, 5, e9171.
- Ambros,V. (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107, 823–826.
- Ambros,V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431, 350–355.
- Anandacoomarasamy A, Caterson I, Sambrook P et al. The impact of obesity on the musculoskeletal system. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 211–222.
- Angela L. Riffo-Campos, Ismael Riquelme and Priscilla Brebi_Mieville (2016) Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *International Journal of Molecular Sciences*.
- Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, et al.: Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res*. 2011; 29(6): 802–9.
- Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG et al. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *J Rheumatol* 2006; 33: 2507–2513.
- arcOGEN Consortium, arcOGEN Collaborators, Zeggini E, et al.: Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet*. 2012; 380(9844): 815–23.
- Ashburner,M., Ball,C.A., Blake,J.A., Botstein,D., Butler,H., Cherry,J.M., Davis,A.P., Dolinski,K., Dwight,S.S., Eppig,J.T. et al. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.*, 25, 25–29.
- Aygun AD, Gungor S, Ustundag B et al. Proinflammatory cytokines and leptin are increased in serum of prepubertal obese children. *Mediators Inflamm* 2005; 2005: 180–183.
- Bader,A.G., Brown,D., Stoudemire,J. and Lammers,P. (2011) Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther.*, 18, 1121–1126.

Bar,M., Wyman,S.K., Fritz,B.R., Qi,J., Garg,K.S., Parkin,R.K., Kroh,E.M., Bendoraite,A., Mitchell,P.S., Nelson,A.M. et al. (2008) MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells*, 26, 2496–2505.

Barenboim,M., Zoltick,B.J., Guo,Y. and Weinberger,D.R. (2010) MicroSNiPer: a web tool for prediction of SNP effects on putative microRNA targets. *Hum. Mutat.*, 31, 1223–1232.

Bartel,D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215–233.

Bandyopadhyay,S. and Bhattacharyya,M. (2010) PuTmiR: a database for extracting neighboring transcription factors of human microRNAs. *BMC Bioinform.*, 11, 190.

Barnholtz-Sloan JS, Severson RK, Stanton B, et al.: Pediatric brain tumors in non-Hispanics, Hispanics, African Americans and Asians: differences in survival after diagnosis. *Cancer Causes Control*. 2005; 16(5): 587–92.

Betel,D., Koppal,A., Agius,P., Sander,C. and Leslie,C. (2010) Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.*, 11, R90.

Ben-Hur,A. and Weston,J. (2010) A user’s guide to support vector machines. *Methods Mol. Biol.*, 609, 223–239.

Bentwich,I., Avniel,A., Karov,Y., Aharonov,R., Gilad,S., Barad,O., Barzilai,A., Einat,P., Einav,U., Meiri,E. et al. (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.*, 37, 766–770.

Betel,D., Wilson,M., Gabow,A., Marks,D.S. and Sander,C. (2008) The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.*, 36, D149–D153.

Bhattacharya,A. and Cui,Y. (2015) miR2GO: comparative functional analysis for microRNAs. *Bioinformatics*, 31, 2403–2405.

Bhattacharya,A., Ziebarth,J.D. and Cui,Y. (2012) SomamiR: a database for somatic mutations impacting microRNA function in cancer. *Nucleic Acids Res.*, 41, D977–D982

Bhattacharya,A., Ziebarth,J.D. and Cui,Y. (2014) PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Res.*, 42, D86–D91.

Betel, D.; Koppal, A.; Agius, P.; Sander, C.; Leslie, C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 2010, 11, R90.

Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP: Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet.* 2011; 377(9783): 2115–26.

Bijsterbosch J, Kloppenburg M, Reijnders M, et al.: Association study of candidate genes for the progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21(4): 565–9.

Blaney Davidson EN, Remst DF, Vitters EL et al. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. *J Immunol* 2009; 182: 7937–7945.

Borchert, G.M., Lanier, W. and Davidson, B.L. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 1097–1101.

Bohnsack, M.T., Czapinski, K. and Gauthier, D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10, 185–191.

Bos SD, Slagboom PE, Meulenbelt I: New insights into osteoarthritis: early developmental features of an ageing-related disease. *Curr Opin Rheumatol.* 2008; 20(5): 553–9.

Brennecke, J.; Stark, A.; Russell, R.B.; Cohen, S.M. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005, 3, 0404–0418.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.*, 3, e85.

Bruno, A.E., Li, L., Kalabus, J.L., Pan, Y., Yu, A. and Hu, Z. (2012) miRdSNP: a database of disease-associated SNPs and microRNA target sites on 3' UTRs of human genes. *BMC Genomics*, 13, 44.

Brown ML, Yukata K, Farnsworth CW et al. Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6 J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2014; 9: e99656.

Bunout D, Munoz C, Lopez M et al. Interleukin 1 and tumor necrosis factor in obese alcoholics compared with normal-weight patients. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 373–376

Calin, G.A. and Croce, C.M. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer*, 6, 857–866.

Calin,G.A., Dumitru,C.D., Shimizu,M., Bichi,R., Zupo,S., Noch,E., Aldler,H., Rattan,S., Keating,M., Rai,K. et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 15524–15529.

Carlson KM, Yamaga KM, Reinker KA, et al.: Precocious osteoarthritis in a family with recurrent COL2A1 mutation. *J Rheumatol.* 2006; 33(6): 1133–6.

Cheng,H., Zhang,L., Cogdell,D.E., Zheng,H., Schetter,A.J., Nykter,M., Harris,C.C., Chen,K., Hamilton,S.R. and Zhang,W. (2011) Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PloS One*, 6, e17745.

Chen,X., Liu,M.-X., Cui,Q.-H. and Yan,G.-Y. (2012) Prediction of disease-related interactions between microRNAs and environmental factors based on a semi-supervised classifier. *PloS One*, 7, e43425.

Chiromatzo,A.O., Oliveira,T.Y., Pereira,G., Costa,A.Y., Montesco,C.A., Gras,D.E., Yosetake,F., Vilar,J.B., Cervato,M., Prado,P.R. et al. (2007) miRNApath: a database of miRNAs, target genes and metabolic pathways. *Genet. Mol. Res.*, 6, 859–865.

Cho,S., Jang,I., Jun,Y., Yoon,S., Ko,M., Kwon,Y., Choi,I., Chang,H., Ryu,D., Lee,B. et al. (2013) MiRGator v3. 0: a microRNA portal for deep sequencing, expression profiling and mRNA targeting. *Nucleic Acids Res.*, 41, D252–D257.

Choi,W.-Y., Giraldez,A.J. and Schier,A.F. (2007) Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science*, 318, 271–274.

Consortium, T.E.P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012, 489,91–100.

Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000602

Cui,Q., Yu,Z., Purisima,E.O. and Wang,E. (2006) Principles of microRNA regulation of a human cellular signaling network. *Mol. Syst. Biol.*, 2.

Cunningham, F.; Amode, M.R.; Barrell, D.; Beal, K.; Billis, K.; Brent, S.; Carvalho-Silva, D.; Clapham, P.; Coates, G.; Fitzgerald, S.; et al. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, D662–D669.

Conde J, Scotece M, Gomez R et al. Adipokines and osteoarthritis: novel molecules involved in the pathogenesis and progression of disease. *Arthritis* 2011; 2011: 203901.

Condorelli,G., Latronico,M.V.G. and Cavarretta,E. (2014) microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 63, 2177–2187.

Cong, L.; Zhu, Y.; Tu, G. A bioinformatics analysis of microRNAs role in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 2017, 25, 1362–1371

E.B. de Sousa, G.C. dos Santos, Junior, M.E.L. Duarte, V. Moura, Neto, and D.P. Aguiar (2017). Metabolomics as a promising tool for early osteoarthritis diagnosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*

Ebert,M.S., Neilson,J.R. and Sharp,P.A. (2007) MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods*, 4, 721–726.

Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* 2001; 17: 953–966.

Da Wei Huang,Brad T. Sherman, Robert Stephens, Michael W. Baseler, H. Clifford Lane, Richard A. Lempicki (2008). DAVID gene ID conversion tool. www.bioinfomation.net, 428-430.

Delgado-Calle J, Fernández AF, Sainz J, et al.: Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(1): 197–205.

den Hollander W, Ramos YF, Bos SD et al. Knee and hip articularcartilage have distinct epigenomic landscapes: implications for future cartilage regeneration approaches. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 2208–2212.

De Palma, A.; Cheleschi, S.; Pascarelli, N.A.; Tenti, S.; Galeazzi, M.; Fioravanti, A. Do microRNAs have a key epigenetic role in osteoarthritis and in mechanotransduction? *Clin. Exp. Rheumatol.* 2017, 35, 518–526

Doench, J.G.; Sharp, P.A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.*2004, 6, 504–511.

Echevarría-Vargas,I.M., Valiyeva,F. and Vivas-Mejía,P.E. (2014) Upregulation of miR-21 in cisplatin resistant ovarian cancer via JNK-1/c-Jun pathway. *PloS One*, 9, e97094.

Dillon CF, Rasch EK, Gu Q et al. Prevalence of knee osteoarthritis in the United States: arthritis data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey 1991-94. *J Rheumatol* 2006; 33: 2271–2279.

Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2003; 52: 1799–1805

Elefant,N., Berger,A., Shein,H., Hofree,M., Margalit,H. and Altuvia,Y. (2011) RepTar: a database of predicted cellular targets of host and viral miRNAs. *Nucleic Acids Res.*, D188–D194.

Enright, A.J.; John, B.; Gaul, U.; Tuschl, T.; Sander, C.; Marks, D.S. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* 2003, 5, 1–14

Eiring,A.M., Harb,J.G., Neviani,P., Garton,C., Oaks,J.J., Spizzo,R., Liu,S., Schwind,S., Santhanam,R., Hickey,C.J. et al. (2010) miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, 140, 652–665.

Eyre DR, Wu JJ, Fernandes RJ, et al.: Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30(Pt 6): 893–9.

Fain JN. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 513948.

Felson DT, Anderson JJ, Naimark A et al. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1988; 109: 18–24.

Felson DT, Couropmitree NN, Chaisson CE, et al.: Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum.* 1998; 41(6): 1064–71.

Felson DT. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 2006; 354: 841–848.

Felson DT, Naimark A, Anderson J et al. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 914–918.

Fernández-Tajes J, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, et al.: Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(4): 668–77.

Felli,N., Fontana,L., Pelosi,E., Botta,R., Bonci,D., Facchiano,F., Liuzzi,F., Lulli,V., Morsilli,O., Santoro,S. et al. (2005) MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 18081–18086.

Friard,O., Re,A., Taverna,D., De Bortoli,M. and Cor´a,D. (2010) CircuitsDB: a database of mixed microRNA/transcription factor feed-forward regulatory circuits in human and mouse. *BMC Bioinform.*, 11, 435.

Farh,K.K.-H., Grimson,A., Jan,C., Lewis,B.P., Johnston,W.K., Lim,L.P., Burge,C.B. and Bartel,D.P. (2005) The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*, 310, 1817–1821.

Felson DT: Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*. 2006; 354(8): 841–8.

Fernandez-Tajes J, Soto-Hermida A, Vazquez-Mosquera ME et al. Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 668–677

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002; 39: 237–246.

Friedman, R.C.; Farh, K.K.-H.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009, 19, 92–105.

Friedlander,M.R., Chen,W., Adamidi,C., Maaskola,J., Einspanier,R., Knespel,S. and Rajewsky,N. (2008) Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat. Biotechnol.*, 26, 407–415.

Gaidatzis,D., van Nimwegen,E., Hausser,J. and Zavolan,M. (2007) Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinform.*, 8, 69.

Gaidatzis, D.; van Nimwegen, E.; Hausser, J.; Zavolan, M. Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinform.* 2007, 8, 69.

Garcia, D.M.; Baek, D.; Shin, C.; Bell, G.W.; Grimson, A.; Bartel, D.P. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decreases the proficiency of Isy-6 and other miRNA's. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011, 18, 1139–1146.

Garzon,R., Marcucci,G. and Croce,C.M. (2010) Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9, 775–789.

Gennarino,V.A., D'Angelo,G., Dharmalingam,G., Fernandez,S., Russolillo,G., Sanges,R., Mutarelli,M., Belcastro,V., Ballabio,A., Verde,P. et al. (2012) Identification of microRNA-regulated gene networks by expression analysis of target genes. *Genome Res.*, 22, 1163–1172.

Gkirtzou,K., Tsamardinos,I., Tsakalides,P. and Poirazi,P. (2010) MatureBayes: a probabilistic algorithm for identifying the mature miRNA within novel precursors. *PloS One*, 5, e11843.

Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA: The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; 15(9): 1061–9.

Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al.: Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 2005; 434(7033): 644–8.

Goldring MB, Goldring SR: Osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 2007; 213(3): 626–34.

Gong,H., Liu,C.M., Liu,D.P. and Liang,C.C. (2005) The role of small RNAs in human diseases: potential troublemaker and therapeutic tools. *Med. Res. Rev.*, 25, 361–381.

Goodwin W, McCabe D, Sauter E et al. Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death. *J Orthop Res* 2010; 28: 1057–1063

Grimson, A.; Farh, K.K.-H.; Johnston,W.K.; Garrett-Engle, P.; Lim, L.P.; Bartel, D.P. MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* 2007, 27, 91–105

Guay,C. and Regazzi,R. (2013) Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 9, 513–521. Russo,F., Di Bella,S., Nigita,G., Macca,V., Lagana,A., Giugno,R., Pulvirenti,A. and Ferro,A. (2012) miRandola: extracellular circulating microRNAs database. *PLoS One*, 7, e47786

Guo, Z.-W.; Xie, C.; Yang, J.-R.; Li, J.-H.; Yang, J.-H.; Zheng, L. MtiBase: A database for decoding microRNA target sites located within CDS and 5'UTR regions from CLIP-Seq and expression profile datasets. *Database* 2015, 2015, 1–9.

Gu, W.; Xu, Y.; Xie, X.; Wang, T.; Ko, J.; Zhou, T. microRNA-mediated gene regulation The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. *RNA* 2014, 20, 1–7.

Guay,C., Roggli,E., Nesca,V., Jacovetti,C.c. and Regazzi,R. (2011) Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl. Res.*, 157, 253–264.

Gumireddy,K., Young,D.D., Xiong,X., Hogenesch,J.B., Huang,Q. and Deiters,A. (2008) Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 47, 7482–7484.

Hackenberg,M., Rodríguez-Ezpeleta,N. and Aransay,A.M. (2011) miRanalyzer: an update on the detection and analysis of microRNAs in high-throughput sequencing experiments. *Nucleic Acids Res.*, 39, W132–W138.

Hackenberg,M., Sturm,M., Langenberger,D., Falcon-Perez,J.M. and Aransay,A.M. (2009) miRanalyzer: a microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. *Nucleic Acids Res.*, 37, W68–W76.

Hafner,M., Landthaler,M., Burger,L., Khorshid,M., Hausser,J.,Berninger,P., Rothballer,A., Ascano,M. Jr, Jungkamp,A.-C., Munschauer,M. et al. (2010) Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, 141, 129–141.

Hafner, M.; Landthaler, M.; Burger, L.; Khorshid, M.; Berninger, P.; Rothballer, A.; Ascano, M., Jr.; Jungkamp, A.C.; Munschauer, M.; Ulrich, A.; et al. Transcriptome wide identification of RNA binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 2010, 141, 129–141.

Haseeb A, Makki MS, Haqqi TM. Modulation of ten-eleven translocation1 (TET1), Isocitrate Dehydrogenase (IDH) expression, alpha-Ketoglutarate (alpha-KG), and DNA hydroxymethylation levels by interleukin-1beta in primary human chondrocytes. *J Biol Chem* 2014; 289: 6877–6885.

Hiard,S., Charlier,C., Coppieters,W., Georges,M. and Baurain,D. (2010) Patrocles: a database of polymorphic miRNA-mediated gene regulation in vertebrates. *Nucleic Acids Res.*, 38, D640–D651.

Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, et al.: C/EBP β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(5): 1111–23.

Hirschhorn,J.N. and Daly,M.J. (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat. Rev. Genet.*, 6, 95–108.

Hofacker, I.L.; Fontana,W.; Stadler, P.F.; Bonhoeffer, L.S.; Tacker, M.; Schuster, P. Fast folding and comparison of RNA secondary structures. *Monatshefte Chem.* 1994, 125, 167–188.

Hootman JM, Helmick CG: Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(1): 226–9.

Hsu,S.-D., Chu,C.-H., Tsou,A.-P., Chen,S.-J., Chen,H.-C., Hsu,P.W.-C., Wong,Y.-H., Chen,Y.-H., Chen,G.-H. and Huang,H.-D. (2008) miRNAmap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Res.*, 36,D165–D169

Hsu,P.W.C., Huang,H.-D., Hsu,S.-D., Lin,L.-Z., Tsou,A.-P., Tseng,C.-P., Stadler,P.F., Washietl,S. and Hofacker,I.L. (2006) miRNAmap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.*, 34, D135–D139.

Hsu,P.W.-C., Lin,L.-Z., Hsu,S.-D., Hsu,J.B.-K. and Huang,H.-D. (2007) ViTa: prediction of host microRNAs targets on viruses. *Nucleic Acids Res.*, 35, D381–D385.

Hu,Z. and Bruno,A.E. (2011) The Influence of 3'UTRs on MicroRNA function inferred from human SNP data. *Comp. Funct. Genomics*, 2011, 910769.

Huang,T.-H., Fan,B., Rothschild,M.F., Hu,Z.-L., Li,K. and Zhao,S.-H. (2007) MiRFinder: an improved approach and software implementation for genome-wide fast microRNA precursor scans. *BMC Bioinform.*, 8, 341.

Huang, J.C.; Frey, B.J.; Morris, Q.D. Comparing sequence and expression for predicting microRNA targets using GenMiR3. *Pac. Symp. Biocomput.* 2008, 63, 52–63.*Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1987 18 of 18

Huang, J.C.; Morris, Q.D.; Frey, B.J. Bayesian inference of MicroRNA targets from sequence and expression data. *J. Comput. Biol.* 2007, 14, 550–563

Huang,G.T., Athanassiou,C. and Benos,P.V. (2011) mirConnX: condition-specific mRNA-microRNA network integrator. *Nucleic Acids Res.*, 39, W416–W423.

Huang,D.W., Sherman,B.T. and Lempicki,R.A. (2008) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.*, 4, 44–57.

Huang,Y., Zou,Q., Wang,S.P., Tang,S.M., Zhang,G.Z. and Shen,X.J. (2011) The discovery approaches and detection methods of microRNAs. *Mol. Biol. Rep.*, 38, 4125–4135.

Hutvagner,G., McLachlan,J., Pasquinelli,A.E., B'álint, 'E., Tuschl,T. and Zamore,P.D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293, 834–838.

Hsu,S.-D., Tseng,Y.-T., Shrestha,S., Lin,Y.-L., Khaleel,A., Chou,C.-H., Chu,C.-F., Huang,H.-Y., Lin,C.-M., Ho,S.-Y. et al. (2014) miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.*, 42, D78–D85.

Hunter DJ, Schofield D, Callander E: The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014; 10(7): 437–41.

Hsu,S.-D., Lin,F.-M., Wu,W.-Y., Liang,C., Huang,W.-C., Chan,W.-L., Tsai,W.-T., Chen,G.-Z., Lee,C.-J., Chiu,C.-M. et al. (2010) miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.*, 39, D163–D169.

Hsu, J.B.-K.; Chiu, C.-M.; Hsu, S.-D.; Huang, W.-Y.; Chien, C.-H.; Lee, T.-Y.; Huang, H.D. miRTar: An integrated system for identifying miRNA-target interactions in human. *BMC Bioinform.* 2011, 12, 300.

Izzotti, A. and Pulliero, A. (2014) The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 217, 601–627.

Jacobsen, A., Silber, J., Harinath, G., Huse, J.T., Schultz, N. and Sander, C. (2013) Analysis of microRNA-target interactions across diverse cancer types. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20, 1325–1332.

Jeffries MA, Donica M, Baker LW et al. Genome-wide DNA methylation study identifies significant epigenomic changes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 2804–2815

Jeggari, A.; Marks, D.S.; Larsson, E. miRcode: A map of putative microRNA target sites in the long non-coding transcriptome. *Bioinformatics* 2012, 28, 2062–2063.

Jeong C, Lee JY, Kim J, et al.: Novel COL9A3 mutation in a family diagnosed with multiple epiphyseal dysplasia: a case report. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014; 15: 371.

Jiang, Q., Wang, Y., Hao, Y., Juan, L., Teng, M., Zhang, X., Li, M., Wang, G. and Liu, Y. (2009) miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res.*, 37, D98–D104.

Jha, A. and Shankar, R. (2013) miReader: discovering novel mirnas in species without sequenced genome. *PloS One*, 8, e66857.

Jordan JM, Helmick CG, Renner JB et al. Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol* 2007; 34: 172–180.

Joung, J.G.; Hwang, K.B.; Nam, J.W.; Kim, S.J.; Zhang, B.T. Discovery of microRNA-mRNA modules via population-based probabilistic learning. *Bioinformatics* 2007, 23, 1141–1147

Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28, 27–30.

Kannu P, Bateman JF, Belluoccio D, et al.: Employing molecular genetics of chondrodysplasias to inform the study of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(2): 325–34.

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7: 33–42.

Kertesz,M., Iovino,N., Unnerstall,U., Gaul,U. and Segal,E. (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.*, 39, 1278–1284.

Kadri,S., Hinman,V. and Benos,P.V. (2009) HHMMiR: efficient de novo prediction of microRNAs using hierarchical hidden Markov models. *BMC Bioinform.*, 10, S35.

Karolchik, D.; Hinrichs, A.S.; Kent, W.J. The UCSC genome browser. *Curr. Protoc. Bioinform.* 2009, 4, 1–35.

Karolchik, D.; Baertsch, R.; Diekhans, M.; Furey, T.S.; Hinrichs, A.; Lu, Y.T.; Roskin, K.M.; Schwartz, M.; Sugnet, C.W.; Thomas, D.J.; et al. The UCSC genome browser database. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31, 51–54.

Kertesz, M.; Iovino, N.; Unnerstall, U.; Gaul, U.; Segal, E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* 2007, 39, 1278–1284.

Khoury,M.J. and Dorman,J.S. (1998) The human genome epidemiology network. *Am. J. Epidemiol.*, 148, 1–3.

Kaya,K.D., Karakulah,G.k., Yakıcıer,C.M., Acar,A.C. and Konu,O.z. (2011) mESAdb: microRNA expression and sequence analysis database. *Nucleic Acids Res.*, 39, D170–D180.

Kim,D.H., Setrom,P.I., Snve,O. and Rossi,J.J. (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 16230–16235.

Kim JH, Jeon J, Shin M, et al.: Regulation of the catabolic cascade in osteoarthritis by the zinc-ZIP8-MTF1 axis. *Cell*. 2014; 156(4): 730–43.

Kim J, Xu M, Xo R et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 424–432.

Kowarsch,A., Preusse,M., Marr,C. and Theis,F.J. (2011) miTALOS: analyzing the tissue-specific regulation of signaling pathways by human and mouse microRNAs. *RNA*, 17, 809–819.

Kozomara,A. and Griffiths-Jones,S. (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 42, D68–D73.

Kozomara, A.; Griffiths-Jones, S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42,

Krügner, J. and Rehmsmeier, M. (2006) RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res.*, 34, W451–W454.

Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB: Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007; 65(3): 222–8.

Krek, A.; Grün, D.; Poy, M.N.; Wolf, R.; Rosenberg, L.; Epstein, E.J.; MacMenamin, P.; da Piedade, I.; Gunsalus, K.C.; Stoffel, M.; et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 2005, 37, 495–500.

Krüger, J.; Rehmsmeier, M. RNAhybrid: MicroRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 451–454

Knudson CB, Knudson W: Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12(2): 69–78.

Laganà, A., Forte, S., Giudice, A., Arena, M.R., Puglisi, P.L., Giugno, R., Pulvirenti, A., Shasha, D. and Ferro, A. (2009) miRBase: a miRNA knowledge base. Database, bap008.

Lai, E.C., Tomancak, P., Williams, R.W. and Rubin, G.M. (2003) Computational identification of Drosophila microRNA genes. *Genome Biol.*, 4, R42.

Lall, S., Grün, D., Krek, A., Chen, K., Wang, Y.-L., Dewey, C.N., Sood, P., Colombo, T., Bray, N. and MacMenamin, P. (2006) A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*. *Curr. Biol.*, 16, 460–471.

Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulton, J., Wainscoat, J.S. et al. (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 141, 672–675.

Le Béchec, A., Portales-Casamar, E., Vetter, G., Moes, M., Zindy, P.-J., Saumet, A., Arenillas, D., Theillet, C., Wasserman, W.W., Lecellier, C.-H. et al. (2011) MIR@NT@N: a framework integrating transcription factors, microRNAs and their targets to identify sub-network motifs in a meta-regulation network model. *BMC Bioinform.*, 12, 67.

Le Brigand, K., Robbe-Sermesant, K., Mari, B. and Barbry, P. (2010) MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics*, 26, 3131–3132.

Lewis, B.P., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15–20.

Lewis, B.P.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005, 120, 15–20.

Lewis, B.P.; Shih, I.-H.; Jones-Rhoades, M.W.; Bartel, D.P. Prediction of mammalian MicroRNA targets. *Cell* 2003, 115, 787–798.

Li YH, Tavallaei G, Tokar T, Nakamura A, Sundararajan K, et al. Identification of synovial fluid microRNA signature in knee osteoarthritis: differentiating early- and late-stage knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage/OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2016;24:1577–1586

Li, Y.P.; Wei, X.C.; Li, P.C.; Chen, C.W.; Wang, X.H.; Jiao, Q.; Wang, D.M.; Wei, F.Y.; Zhang, J.; Wei, L. The role of microRNAs in cartilage homeostasis. *Curr. Genom.* 2015, 16, 393–404

Li, Y.S.; Zhang, F.J.; Zeng, C.; Luo, W.; Xiao, W.F.; Gao, S.G.; Lei, G.H. Autophagy in osteoarthritis. *Jt. Bone Spine* 2016, 83, 143–148.

Li,Z. and Rana,T.M. (2014) Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 13, 622–638.

Li,L., Xu,J., Yang,D., Tan,X. and Wang,H. (2010) Computational approaches for microRNA studies: a review. *Mamm. Genome*, 21, 1–12.

Li,J.-H., Liu,S., Zhou,H., Qu,L.-H. and Yang,J.-H. (2014) starBase v2. 0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.*, 42, D92–D97.

Lim,L.P., Lau,N.C., Weinstein,E.G., Abdelhakim,A., Yekta,S., Rhoades,M.W., Burge,C.B. and Bartel,D.P. (2003) The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.*, 17, 991–1008.

Lim,L.P., Lau,N.C., Garrett-Engle,P., Grimson,A., Schelter,J.M., Castle,J., Bartel,D.P., Linsley,P.S. and Johnson,J.M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433, 769–773.

Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, et al.: Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med*. 2009; 15(12): 1421–5.

Little CB, Barai A, Burkhardt D, et al.: Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(12): 3723–33.

Liu,C.-G., Calin,G.A., Meloon,B., Gamliel,N., Sevignani,C., Ferracin,M., Dumitru,C.D., Shimizu,M., Zupo,S., Dono,M. et al. (2004) An oligonucleotide

microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 9740–9744.

Liu,C., Mallick,B., Long,D., Rennie,W.A., Wolenc,A., Carmack,C.S. and Ding,Y. (2013) CLIP-based prediction of mammalian microRNA binding sites. *Nucleic Acids Res.*, 41, e138–e138.

Liu,C., Zhang,F., Li,T., Lu,M., Wang,L., Yue,W. and Zhang,D. (2012) MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. *BMC Genomics*, 13, 661.

Li,H. and Yang,B.B. (2013) Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacol. Sin.*, 34, 870–879.

Li,S.-C., Shiau,C.-K. and Lin,W.-C. (2008) Vir-Mir db: prediction of viral microRNA candidate hairpins. *Nucleic Acids Res.*, 36, D184–D189.

Li,Y., Qiu,C., Tu,J., Geng,B., Yang,J., Jiang,T. and Cui,Q. (2014) HMDD v2. 0: a database for experimentally supported human microRNA and disease associations. *Nucleic Acids Res.*, 42, 1070–1074.

Liu JT, Guo X, Ma WJ et al. Mitochondrial function is altered in articular chondrocytes of an endemic osteoarthritis, Kashin-Beck disease. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18: 1218–1226

Loher,P. and Rigoutsos,I. (2012) Interactive exploration of RNA22 microRNA target predictions. *Bioinformatics*, 28, 3322–3323.

Loeser RF. Aging and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23: 492–496.

Lorenzen,J.M., Haller,H. and Thum,T. (2011) MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 7, 286–294.

Lorenz, R.; Bernhart, S.; Siederdisen, C.; Tefer, H.; Flamm, C.; Stadler, P.F.; Hofacker, I.L. ViennaRNA package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* 2011, 6, 1–14. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1987 17 of 18

Louer CR, Furman BD, Huebner JL et al. Diet-induced obesity significantly increases the severity of posttraumatic arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 3220–3230

Loughlin J, Mustafa Z, Smith A, et al.: Linkage analysis of chromosome 2q in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2000; 39(4): 377–81

Loughlin J, Dowling B, Chapman K, et al.: Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(26): 9757–62.

Lu,T.-P., Lee,C.-Y., Tsai,M.-H., Chiu,Y.-C., Hsiao,C.K., Lai,L.-C. and Chuang,E.Y. (2012) miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets. *PloS One*, 7, e42390.

Ma,L., Teruya-Feldstein,J. and Weinberg,R.A. (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 449, 682–688.

Mandke, P.;Wyatt, N.; Fraser, J.; Bates, B.; Berberich, S.J.; Markey, M.P. MicroRNA-34a modulates MDM4 expression via a target site in the open reading frame. *PLoS ONE* 2012, 7, e42034

Maragkakis,M., Vergoulis,T., Alexiou,P., Reczko,M., Plomaritou,K., Gousis,M., Kourtis,K., Koziris,N., Dalamagas,T. and Hatzigeorgiou,A.G. (2011) DIANA-microT web server upgrade supports Fly and Worm miRNA target prediction and bibliographic miRNA to disease association. *Nucleic Acids Res.*, 39,W145–W148.

Maragkakis,M., Reczko,M., Simossis,V.A., Alexiou,P.,Papadopoulos,G.L., Dalamagas,T., Giannopoulos,G., Goumas,G., Koukis,E. and Kourtis,K. (2009) DIANA-microT web server:elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res.*, W273–W276.

Martel-Pelletier J, Alaaeddine N, Pelletier JP. Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 1999; 4: D694–D703.

Martinez,N.J. and Walhout,A.J.M. (2009) The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks. *Bioessays*, 31, 435–445.

Mathews, D.H.; Sabina, J.; Zuker, M.; Turner, D.H. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 1999, 288, 911–940.

Maziere,P. and Enright,A.J. (2007) Prediction of microRNA targets. *Drug Discov. Today*, 12, 452–458.

Mendes,N.D., Freitas,A.T. and Sagot,M.F. (2009) Current tools for the identification of miRNA genes and their targets. *Nucleic Acids Res.*, 37, 2419–2433.

Mills,N.L., Donaldson,K., Hadoke,P.W., Boon,N.A., MacNee,W., Cassee,F.R., Sandström,T., Blomberg,A. and Newby,D.E. (2008) Adverse cardiovascular effects of air pollution.*Nat. Clin. Pract. Cardiovasc.Med.*, 6, 36–44.

Miranda,K.C., Huynh,T., Tay,Y., Ang,Y.-S., Tam,W.-L., Thomson,A.M., Lim,B. and Rigoutsos,I. (2006) A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*, 126, 1203–1217.

Milagro,F.I., Miranda,J., Portillo,M.P., Fernandez-Quintela,A., Campi'ón,J. and Mart'inez,J.A. (2013) High-throughput sequencing of microRNAs in peripheral blood mononuclear cells: identification of potential weight loss biomarkers. *PloS One*, 8, e54319.

Miranda, K.C.; Huynh, T.; Tay, Y.; Ang, Y.S.; Tam,W.L.; Thomson, A.M.; Lim, B.; Rigoutsos, I. A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006, 126, 1203–1217.

Mirando AJ, Liu Z, Moore T, et al.: RBP-Jκ-dependent Notch signaling is required for murine articular cartilage and joint maintenance. *Arthritis Rheum*. 2013; 65(10): 2623–33.

Mirzamohammad, F.; Papaioannou, G.; Kobayashi, T. MicroRNAs in cartilage development, homeostasis and disease. *Curr. Osteoporos. Rep*. 2014, 12, 410–419

Mishra,P.J., Humeniuk,R., Mishra,P.J., Longo-Sorbello,G.S.A., Banerjee,D. and Bertino,J.R. (2007) A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 13513–13518.

Mitchell,T.M. (1997) *Machine Learning*. McGraw-Hill Int.

Miyaki, S.; Asahara, H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2012, 8, 543–552

Most Mauluda Akhtar, Luigina Micolucci, Md Soriful Islam, Fbiola Olivieri and Anonio Domenico Procopio. Bioinformatic tools for microRNA dissection (2015) *Nucleic Acids Research* 2016, Vol 44 No 1. 24-33.

Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med* 2011; 208: 417–420

Nam,J.-W., Kim,J., Kim,S.-K. and Zhang,B.-T. (2006) ProMiR II: a web server for the probabilistic prediction of clustered, nonclustered, conserved and nonconserved microRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 34, W455–W458.

Nam,J.-W., Shin,K.-R., Han,J., Lee,Y., Kim,V.N. and Zhang,B.-T. (2005) Human microRNA prediction through a probabilistic co-learning model of sequence and structure. *Nucleic Acids Res.*, 33,3570–3581.

Nam, J.-W.; Rissland, O.S.; Koppstein, D.; Abreu-Goodger, C.; Jan, C.H.; Agarwal, V.; Yildirim, M.A.;Rodriguez, A.; Bartel, D.P. Global analyses of the effect of different cellular contexts on MicroRNA targeting.*Mol. Cell* 2014, 53, 1031–1043.

Nawrocki, E.P.; Burge, S.W.; Bateman, A.; Daub, J.; Eberhardt, R.Y.; Eddy, S.R.; Floden, E.W.; Gardner, P.P.; Jones, T.A.; Tate, J.; et al. Rfam 12.0: Updates to the RNA families database. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43,

Nelson, P.T., Baldwin, D.A., Kloosterman, W.P., Kauppinen, S., Plasterk, R.H. and Mourelatos, Z. (2006) RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA*, 12, 187–191.

Neels JG, Badeanlou L, Hester KD et al. Keratinocyte-derived chemokine in obesity: expression, regulation, and role in adipose macrophage infiltration and glucose homeostasis. *J Biol Chem* 2009; 284: 20692–20698.

Ntounou E, Tzetzis M, Braoudaki M, Lambrou G, Poulou M, Malizos K, Stefanou N, Anastasopoulou L, Tsezou A. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. *Clinical Epigenetics* (2017) 9:127

Nugent, M. MicroRNAs: Exploring new horizons in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 2016, 24, 573–580

O’Leary, N.A.; Wright, M.W.; Brister, J.R.; Ciufo, S.; Haddad, D.; McVeigh, R.; Rajput, B.; Robbertse, B.; Smith-White, B.; Ako-Adjei, D.; et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, D733–D745.

Olivieri, F., Antonicelli, R., Spazzafumo, L., Santini, G., Rippo, M.R., Galeazzi, R., Giovagnetti, S., D’Alessandra, Y., Marcheselli, F., Capogrossi, M.C. et al. (2014) Admission levels of circulating miR-499–5p and risk of death in elderly patients after acute non-ST elevation myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.*, 172, e276–e278.

Olivieri, F., Rippo, M.R., Monsurro, V., Salvioli, S., Capri, M., Procopio, A.D. and Franceschi, C. (2013) MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Res. Rev.*, 12, 1056–1068.

Ørom, U.A.; Nielsen, F.C.; Lund, A.H. MicroRNA-10a binds the 50 UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* 2008, 30, 460–471.

Oulas, A. and Poirazi, P. (2011) *MicroRNA and Cancer*. Springer, pp. 243–252.

Oulas, A., Boutla, A., Gkirtzou, K., Reczko, M., Kalantidis, K. and Poirazi, P. (2009) Prediction of novel microRNA genes in cancer-associated genomic regions - a combined computational and experimental approach. *Nucleic Acids Res.*, 37, 3276–3287.

- Pan,X., Wang,Z.-X. and Wang,R. (2010) MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biol. Ther.*, 10, 1224–1232.
- Papadopoulos,G.L., Alexiou,P., Maragkakis,M., Reczko,M. and Hatzigeorgiou,A.G. (2009) DIANA-mirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways. *Bioinformatics*, 25, 1991–1993.
- Paraskevopoulou,M.D., Georgakilas,G., Kostoulas,N., Vlachos,I.S., Vergoulis,T., Reczko,M., Filippidis,C., Dalamagas,T. and Hatzigeorgiou,A.G. (2013) DIANA-microT web server v5. 0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res.*, 41, W169–W173.
- Pfeffer,S.b., Zavolan,M., Grasser,F.A., Chien,M., Russo,J.J., Ju,J., John,B., Enright,A.J., Marks,D., Sander,C. et al. (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304, 734–736.
- Pillai,R.S. (2005) MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*, 11, 1753–1761.
- Pineau,P., Volinia,S., McJunkin,K., Marchio,A., Battiston,C., Terris,B., Mazzaferro,V., Lowe,S.W., Croce,C.M. and Dejean,A. (2010) miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 264–269.
- Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; 116: 1234–1241.
- Rajewsky,N. (2006) microRNA target predictions in animals. *Nat. Genet.*, 38, S8–S13.
- Rebane,A. and Akdis,C.A. (2014) MicroRNAs in allergy and asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 14, 1–9.
- Reczko,M., Maragkakis,M., Alexiou,P., Grosse,I. and Hatzigeorgiou,A.G. (2012) Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics*, 28, 771–776.
- Reczko, M.; Maragkakis, M.; Alexiou, P.; Grosse, I.; Hatzigeorgiou, A.G. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 2012, 28, 771–776.
- Rennie,W., Liu,C., Carmack,C.S., Wolenc,A., Kanoria,S., Lu,J., Long,D. and Ding,Y. (2014) STarMir: a web server for prediction of microRNA binding sites. *Nucleic Acids Res.*, 42, W114–W118.
- Rehmsmeier,M., Steffen,P., Hochsmann,M. and Giegerich,R. (2004) Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10, 1507–1517.

Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev* 2003; 2: 245–261.

Rodriguez RR, Seegmiller RE, Stark MR, et al.: A type XI collagen mutation leads to increased degradation of type II collagen in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004; 12(4): 314–20.

Ruepp,A., Kowarsch,A., Schmidl,D., Buggenthin,F., Brauner,B., Dunger,I., Fobo,G., Frishman,G., Montrone,C. and Theis,F.J. (2010) PhenomiR: a knowledgebase for microRNA expression in diseases and biological processes. *Genome Biol.*, 11, R6.

Rushton MD, Reynard LN, Barter MJ, et al.: Characterization of the cartilage DNA methylome in knee and hip osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014; 66(9): 2450–60.

Ryan,B., Robles,A.I. and Harris,C.C. (2010) Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer*, 10, 389–402.

Sales,G., Coppe,A., Bisognin,A., Biasiolo,M., Bortoluzzi,S. and Romualdi,C. (2010) MAGIA, a web-based tool for miRNA and Genes Integrated Analysis. *Nucleic Acids Res.*, 38, W352–W359.

Salmena, L.; Poliseno, L.; Tay, Y.; Kats, L.; Pandolfi, P.P. A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell* 2011, 146, 353–358.

Schnall-Levin, M.; Rissland, O.S.; Johnston,W.K.; Perrimon, N.; Bartel, D.P.; Berger, B. Unusually effective microRNA targeting within repeat-rich coding regions of mammalian mRNAs. *Genome Res*. 2011, 21, 1395–1403.

Sethupathy, P.; Corda, B.; Hatzigeorgiou, A.G. TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets TarBase. *RNA* 2006, 12, 192–197

Shirdel,E.A., Xie,W., Mak,T.W. and Jurisica,I. (2011) NAViGaTing the micronome - using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PloS One*, 6, e17429.

Sheng,Y., Engstrom,P.G. and Lenhard,B. (2007) Mammalian microRNA prediction through a support vector machine model of sequence and structure. *PloS One*, 2, e946.72.

Sandell LJ: Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. *Nat Rev Rheumatol*. 2012; 8(2): 77–89.

- Santamaria,X. and Taylor,H. (2014) MicroRNA and gynecological reproductive diseases. *Fertil. Steril.*, 101, 1545–1551.
- Shen J, Li J, Wang B, et al.: Deletion of the transforming growth factor β receptor type II gene in articular chondrocytes leads to a progressive osteoarthritis-like phenotype in mice. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(12): 3107–19.
- Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, et al.: Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol.* 1997; 139(2): 541–52.
- Siomi,H. and Siomi,M.C. (2010) Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol. Cell*, 38, 323–332.
- Sondag, G.R.; Haqqi, T.M. The role of microRNAs and their targets in osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2016, 18, 56.
- Soto,A.M. and Sonnenschein,C. (2010) Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 6, 363–370.
- Stanton H, Rogerson FM, East CJ, et al.: ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature.* 2005; 434(7033): 648–52.
- Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW et al. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes* 2002; 51: 1157–1165
- Strackowski M, Dzienis-Strackowska S, Stepień A et al. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4602–4606.
- Spector TD, Cicuttini F, Baker J, et al.: Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ.* 1996; 312(7036): 940–3.
- Tavazoie,S.F., Alarcón,C., Oskarsson,T., Padua,D., Wang,Q., Bos,P.D., Gerald,W.L. and Massagué,J. (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, 451, 147–152.
- Takamizawa,J., Konishi,H., Yanagisawa,K., Tomida,S., Osada,H., Endoh,H., Harano,T., Yatabe,Y., Nagino,M., Nimura,Y. et al. (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*, 64, 3753–3756.

- Taylor SE, Smeriglio P, Dhulipala L et al. A global increase in 5-hydroxymethylcytosine levels marks osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 90–100.
- Taylor SE, Li YH, Wong WH et al. Genome-wide mapping of DNA hydroxymethylation in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 2129–214
- Tibiche,C. and Wang,E. (2008) MicroRNA regulatory patterns on the human metabolic network. *Open Syst. Biol. J.*, 1, 1–8.
- Terai,G., Komori,T., Asai,K. and Kin,T. (2007) miRRim: a novel system to find conserved miRNAs with high sensitivity and specificity. *RNA*, 13, 2081–2090.
- Thomas,L.F., Saito,T. and Sætrom,P.I. (2011) Inferring causative variants in microRNA target sites. *Nucleic Acids Res.*, 39, e109.
- Thomson,D.W., Bracken,C.P. and Goodall,G.J. (2011) Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res.*, 39, 6845–6853.
- Thum,T. (2012) MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO Mol. Med.*, 4, 3–14.
- Thum,T., Gross,C., Fiedler,J., Fischer,T., Kissler,S., Bussen,M., Galuppo,P., Just,S., Rottbauer,W., Frantz,S. et al. (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456, 980–984.
- Tsezou A., (2014). Osteoarthritis year in review 2014: genetics and genomics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014 Dec;22(12):2017-24
- van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. A role for age-related changes in TGF- β signaling in aberrant chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: 201–209.
- Vasudevan,S., Tong,Y. and Steitz,J.A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318, 1931–1934.
- Van Rooij,E. and Kauppinen,S. (2014) Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.*, 6, 851–864.
- van Saase JL, van Romunde LK, Cats A et al. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 271–280.
- V´arallyay, ´ E., Burgy´an,J. and Havelda,Z. (2007) Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods*, 43, 140–145.

- Veksler-Lublinsky,I., Shemer-Avni,Y., Kedem,K. and Ziv-Ukelson,M. (2010) Gene bi-targeting by viral and human miRNAs. *BMC Bioinform.*, 11, 249.
- Vergoulis,T., Vlachos,I.S., Alexiou,P., Georgakilas,G., Maragkakis,M., Reczko,M., Gerangelos,S., Koziris,N., Dalamagas,T. and Hatzigeorgiou,A.G. (2012) TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. *Nucleic Acids Res.*, 40, D222–D229.
- Vester,B. and Wengel,J. (2004) LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, 43, 13233–13241.
- Visser M. Higher levels of inflammation in obese children. *Nutrition* 2001; 17: 480–481.
- Vlachos, I.S.; Paraskevopoulou, M.D.; Karagkouni, D.; Georgakilas, G.; Vergoulis, T.; Kanellos, I.; Anastasopoulos, I.L.; Maniou, S.; Karathanou, K.; Kalfakakou, D.; et al. DIANA-TarBase v7.0: Indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, D153–D159
- Vlachos,I.S., Zagganas,K., Paraskevopoulou,M.D., Georgakilas,G., Karagkouni,D., Vergoulis,T., Dalamagas, Hatzigeorgiou,A.G. (2015) DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.*, 43, W460–W466.
- Vlachos,I.S., Kostoulas,N., Vergoulis,T., Georgakilas,G., Reczko,M., Maragkakis,M., Paraskevopoulou,M.D., Prionidis,K., Dalamagas,T. and Hatzigeorgiou,A.G. (2012) DIANA miRPath v. 2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res.*, 40, W498–W504.
- Valdes AM, Spector TD, Tamm A, et al.: Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(8): 2347–52.
- van den Berg WB: Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011; 19(4): 338–41.
- Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, et al.: Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2000; 275(50): 39027–31.
- Vlachos,I.S., Paraskevopoulou,M.D., Karagkouni,D., Georgakilas,G., Vergoulis,T., Kanellos,I., Anastasopoulos,I.-L., Maniou,S., Karathanou,K., Kalfakakou,D. et al. (2015) DIANA-TarBase v7. 0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA: mRNA interactions. *Nucleic Acids Res.*, 43, D153–D159.

- Wang,X. (2008) miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*, 14, 1012–1017.
- Wang,J., Lu,M., Qiu,C. and Cui,Q. (2010) TransmiR: a transcription factor-microRNA regulation database. *Nucleic Acids Res.*, 38, D119–D122.
- Wang M, Shen J, Jin H, et al.: Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1240: 61–9.
- Wang , Y.; Li, Y.; Toth, J.I.; Petroski, M.D.; Zhang, Z.; Zhao, J.C. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 2014, 16, 191–198.
- Wang,D., Gu,J., Wang,T. and Ding,Z. (2014) OncomiRDB: a database for the experimentally verified oncogenic and tumor-suppressive microRNAs. *Bioinformatics*, 30, 2237–2238.
- Wang M, Tang D, Shu B, et al.: Conditional activation of β -catenin signaling in mice leads to severe defects in intervertebral disc tissue. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(8): 2611–23.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115: 1111–1119.
- Winter,J., Jung,S., Keller,S., Gregory,R.I. and Diederichs,S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.*, 11, 228–234.
- Wu, C.; Tian, B.; Qu, X.; Liu, F.; Tang, T.; Qin, A.; Zhu, Z.; Dai, K. MicroRNAs play a role in chondrogenesis and osteoarthritis (review). *Int. J. Mol. Med.* 2014, 34, 13–23
- Xiao,F., Zuo,Z., Cai,G., Kang,S., Gao,X. and Li,T. (2009) miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.*, 37, D105–D110.
- Wong,N. and Wang,X. (2014) miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.*, 43, D146–D152.
- Xiao, F.; Zuo, Z.; Cai, G.; Kang, S.; Gao, X.; Li, T. miRecords: An integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 105–110.
- Xie,B., Ding,Q., Han,H. and Wu,D. (2013) miRCancer: a microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature. *Bioinformatics*, 29, 638–644.
- Xu,W.; San Lucas, A.;Wang, Z.; Liu, Y. IdentifyingmicroRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinform.*2014, 15 (Suppl. 7), S4.

- Yang,Q., Qiu,C., Yang,J., Wu,Q. and Cui,Q. (2011) miREnvironment database: providing a bridge for microRNAs, environmental factors and phenotypes. *Bioinformatics*, 27, 3329–3330.
- Yang,J.-H., Li,J.-H., Jiang,S., Zhou,H. and Qu,L.-H. (2013) ChIPBase: a database for decoding the transcriptional regulation of long non-coding RNA and microRNA genes from ChIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.*, 41, D177–D187.
- Yang X, Chen L, Xu X, et al.: TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol*. 2001; 153(1): 35–46.
- Yu, C.; Chen, W.P.; Wang, X.H. MicroRNA in osteoarthritis. *J. Int. Med. Res*. 2011, 39, 1–9
- Yousef,M., Jung,S., Kossenkova,A.V., Showe,L.C. and Showe,M.K. (2007) Naïve Bayes for microRNA target predictions-machine learning for microRNA targets. *Bioinformatics*, 23, 2987–2992.
- Yu,X., Lin,J., Zack,D.J.,Mendell,J.T. and Qian,J. (2008) Analysis of regulatory network topology reveals functionally distinct classes of microRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 36, 6494–6503.
- Yang,J.-H., Li,J.-H., Shao,P., Zhou,H., Chen,Y.-Q. and Qu,L.-H. (2011) starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data. *Nucleic Acids Res.*, 39, D202–D209.
- Yousef,M., Nebozhyn,M., Shatkay,H., Kanterakis,S., Showe,L.C. and Showe,M.K. (2006) Combining multi-species genomic data for microRNA identification using a Naive Bayes classifier. *Bioinformatics*, 22, 1325–1334.
- Zeng,Y. and Cullen,B.R. (2004) Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.*, 32, 4776–4785.
- Zhang,Y. (2005) miRU: an automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Res.*, 33, W701–W704.
- Zhang, Y. miRU: An automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Res*. 2005, 33, 701–704.
- Zhang, M.; Lygrisse, K.; Wang, L. Role of microRNA in osteoarthritis. *J. Arthritis* 2017, 6, 239
- Zhou Q, Leeman SE, Amar S. Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 2867–2872.

- Ziebarth,J.D., Bhattacharya,A., Chen,A. and Cui,Y. (2012) PolymiRTS Database 2.0: linking polymorphisms in microRNA target sites with human diseases and complex traits. *Nucleic Acids Res.*, 40, D216–D221.
- Ziebarth,J.D., Bhattacharya,A. and Cui,Y. (2012) Integrative analysis of somatic mutations altering microRNA targeting in cancer genomes. *PLoS One*, 7, e47137.
- Zhang, D.; Xiao, Y.F.; Zhang, J.W.; Xie, R.; Hu, C.J.; Tang, B.; Wang, S.M.; Wu, Y.Y.; Hao, N.B.; Yang, S.M. MiR-1182 attenuates gastric cancer proliferation and metastasis by targeting the open reading frame of hTERT. *Cancer Lett.* 2015, 360, 151–159.
- Zhang, S.; Li, Q.; Liu, J.; Zhou, X.J. A novel computational framework for simultaneous integration of multiple types of genomic data to identify microrna-gene regulatory modules. *Bioinformatics* 2011, 27,401–409.
- Zhang,B., Pan,X., Cobb,G.P. and Anderson,T.A. (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.*, 302, 1–12.
- Zhang Y, Jordan JM: Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med.* 2010; 26(3): 355–69.
- Zhang, M.;Wang, J. Epigenetics and osteoarthritis. *Genes Dis.* 2015, 2, 69–75.
- Zhang R, Yao J, Xu P, et al.: A comprehensive meta-analysis of association between genetic variants of GDF5 and osteoarthritis of the knee, hip and hand. *Inflamm Res.* 2015; 64(6): 405–14.
- Zheng,H., Liu,J.-Y., Song,F.-J. and Chen,K.-X. (2013) Advances in circulating microRNAs as diagnostic and prognostic markers for ovarian cancer. *Cancer Biol. Med.*, 10, 123–130.
- Zhao,Y.-N., Chen,G.-S. and Hong,S.-J. (2014) Circulating MicroRNAs in gynecological malignancies: from detection to prediction. *Exp. Hematol. Oncol.*, 3, 14.